

Desenvolvimento de uma bebida fermentada à base de mel

Guilherme Miguel Felício da Silva Pimentel

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Professora Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista

Júri:

Presidente: Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com Agregação,
Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar com
Agregação, Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista, Professora Auxiliar, Instituto Superior de
Agronomia da Universidade de Lisboa

Agradecimentos

À Professora Catarina Prista, do Instituto Superior de Agronomia, agradeço toda a disponibilidade, apoio prestado e transmissão de conhecimento ao longo da elaboração deste trabalho.

Às colegas de laboratório, que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste projeto, Rafaela Santos, Sara Carvalho e Andreia Filipa.

Aos meus amigos Daniel Costa, Vasco Gonçalves, Hugo Almeida, Vasco Pires, Eduardo Costa, Teresa Galamba e Inês Silva por toda a força e apoio ao longo desta fase.

À Mariana Pereira, um agradecimento especial por todo o amor, apoio diário e transmissão de confiança e força.

À minha família, em especial aos meus pais, irmã e avós, um enorme obrigado pelo apoio incondicional, incentivo e por todos os ensinamentos de vida.

A todos, dedico este trabalho

Resumo

Com a indústria alimentar cada vez mais competitiva e exigente, quer a nível de qualidade quer a nível de segurança, e com os consumidores a procurarem satisfazer as suas preferências, tornou-se crucial para as empresas o desenvolvimento de novos produtos, levando a um crescente investimento na área da inovação dos mesmos.

O principal objetivo deste trabalho foi a criação de um bebida fermentada produzida a partir de mel, este novo produto foi idealizado pela professora Catarina Pristas tendo em conta uma possível valorização do alimento base.

O método utilizado para a criação deste espumante teve como princípio o processo de produção do espumante de vinho, mediante algumas alterações. Foi necessário estudar várias diluições de modo a obter a percentagem de açúcares totais mais indicada, açúcares estes que são fermentados por leveduras, dando origem à produção de etanol.

Numa primeira fase, foram testadas diversas formulações, com vista a determinar quais os tipos de mel que davam origem à melhor bebida a nível organolético, variando as diluições dos mesmos e o tempo de fermentação.

Após o teste de 34 formulações, o mel de urze e o de eucalipto foram considerados os preferíveis para a produção da bebida fermentada, sendo de entre as quatro diluições comparadas a 1:6 foi a que conferiu melhor perfil a nível aromático ao produto final.

A avaliação sensorial por parte do painel de provadores não treinados (consumidores) permitiu verificar que, independentemente do mel utilizado, o período de fermentação favorito é o de 4 dias. Quer para a diluição urze 1:6 quer para a eucalipto 1:6 foi nas fermentações de 4 dias que se obtiveram os valores mais altos de intenção de compra, sendo estes 4,95 e 4,9 respetivamente.

Palavras-chave: *mel – fermentação alcoólica – células imobilizadas – espumante de mel – Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

With the food industry getting increasingly more competitive and demanding (in both quality and security) and with consumers seeking to satisfy their preferences, it has become crucial for companies to develop new products, leading to a growing investment in innovation.

The main objective of this study was the creation of a fermented drink made from honey. This new product was conceived by Professor Catarina given the possibility of honey appreciation.

The method used to create this sparkling drink had as its foundation the sparkling wine production process, though with some changes. It was necessary to study various dilutions to obtain the most suitable percentage of total sugars, these sugars are fermented by yeasts, giving ethanol.

Initially, various formulations were tested to determine which types of honey gave the best drink at an organoleptic level, varying their dilutions and fermentation times.

After testing 34 formulations, heather honey and eucalyptus were considered preferable for producing the sparkling drink. From the four dilutions compared, the 1: 6 was the one that gave the best aromatic profile.

Sensory evaluation executed by an untrained tasting panel (consumers) has shown that no matter of the honey used, the favorite fermentation period is 4 days. In the heather dilution 1: 6 and eucalyptus 1: 6 (with 4 days fermentations) it was observed the highest values of purchase intention were procured, at 4.95 and 4.9 respectively.

Keywords: *honey – alcoholic fermentation – immobilized cells – sparkling honey – Saccharomyces cerevisiae*

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
1. Introdução	1
1.1. Enquadramento teórico	1
1.1.1. Economia e <i>Marketing</i>	1
1.1.2. Vinho espumante	4
1.1.2.1. Características desejadas num vinho espumante	4
1.1.2.2. Etapas de produção (método clássico)	5
1.1.3. Mel	7
1.1.3.1. Variedades de mel.....	7
1.1.3.2. Composição.....	8
1.1.3.3. Etapas de produção.....	10
1.1.4. Fermentação alcoólica	11
1.1.4.1. Etapas do processo bioquímico	11
1.1.5. Microrganismos.....	12
1.1.5.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
1.1.5.2. Estrutura celular	12
1.1.5.3. Imobilização celular (IC)	13
1.1.5.4. Fatores que influenciam a atividade enzimática.....	14
1.2. Objetivos	16
2. Material e Métodos	16
2.1. Microrganismo	16
2.2. Bebida base a fermentar	17
2.2.1. Preparação da diluição	17
2.2.2. Filtração da diluição	17
2.3. Processo fermentativo	18
2.3.1. Ensaio preliminares	18
2.3.2. Ensaio de fermentação	20
2.3.3. Ensaio de fermentação com mel caramelizado.....	20
2.4. Tratamento das amostras - HPLC	21
2.4.1. Preparação das amostras	21
2.4.2. Curvas de calibração.....	22

2.4.3.	Preparação do eluente.....	23
2.4.4.	HPLC.....	23
2.5.	Provas sensoriais	24
3.	Resultados e discussão.....	25
3.1.	Densidade	25
3.2.	Avaliação dos principais constituintes dos méis utilizados ao longo do estudo.....	25
3.3.	Avaliação do consumo de substratos e produção de produtos ao longo da fermentação por HPLC (0, 3 e 15 dias)	27
3.3.1.	Análise da evolução da concentração de açúcares ao longo da fermentação	27
3.4.	Análise sensorial.....	37
3.4.1.	Provas sensoriais das formulações	37
3.4.2.	Ensaio preliminares	37
3.4.3.	Ensaio de fermentação	38
3.4.4.	Ensaio finais (prova com a presença do produtor de mel).....	39
3.5.	Formulações finais	40
3.6.	Provas sensoriais das formulações finais.....	42
4.	Considerações finais e perspectivas futuras.....	46
5.	Referências bibliográficas	47

Índice de figuras

FIGURA 1: ESQUEMATIZAÇÃO DO MODELO BOOZ.....	2
FIGURA 2: APIÁRIO E CONSTITUINTES INTERNOS	10
FIGURA 3: ESQUEMATIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA.....	11
FIGURA 4: SIMPLIFICAÇÃO DE UM GRÁFICO DA VELOCIDADE DE REAÇÃO DA ENZIMA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO.....	15
FIGURA 5: FILTROS OBSTRUÍDOS AO LONGO DA FILTRAÇÃO JUNTAMENTE COM ESPÁTULA PARA LIMPAR OS MESMOS.....	18
FIGURA 6: BANHO TERMOSTÁTICO DIGITAL	19
FIGURA 7: SERINGA DE FILTRAÇÃO E SUPORTE PARA FILTRO E VIAL	22
FIGURA 8: SISTEMA DE HPLC	24
FIGURA 9: EXEMPLO DE SACCHAROMYCES DETECTADA E COLÓNIAS DE FUNGOS	28
FIGURA 10: EXEMPLO DE OUTRA LEVEDURA QUE NÃO A SACCHAROMYCES E CONTAMINAÇÃO POR BACTÉRIAS	29
FIGURA 11: VARIAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES E ETANOL NA DILUIÇÃO 1:3 DE MEL DE URZE	29
FIGURA 12: VARIAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES E ETANOL NA DILUIÇÃO 1:4 DE MEL DE URZE	30
FIGURA 13: VARIAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES E ETANOL NA DILUIÇÃO 1:6 DE MEL DE URZE	31
FIGURA 14: VARIAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES, ETANOL E ÁCIDO ACÉTICO NA DILUIÇÃO 1:8 DE MEL DE URZE	32
FIGURA 15: VARIAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES E ETANOL NA DILUIÇÃO 1:3 DE MEL DE ROSMANINHO	33
FIGURA 16: VARIAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES E ETANOL NA DILUIÇÃO 1:4 DE MEL DE ROSMANINHO	34
FIGURA 17: VARIAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES E ETANOL NA DILUIÇÃO 1:6 DE MEL DE ROSMANINHO	35
FIGURA 18: VARIAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES, ETANOL E ÁCIDO ACÉTICO NA DILUIÇÃO 1:8 DE MEL DE ROSMANINHO	36

FIGURA 19: ESQUEMATIZAÇÃO DA IDADE DOS PROVADORES E SEXO DOS MESMOS	42
FIGURA 20: COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS E MERCADO PARA AS FORMULAÇÕES COM 3,4 E 5 DIAS DE FERMENTAÇÃO PARA A DILUIÇÃO 1:6 DE MEL DE URZE	43
FIGURA 21: COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS E MERCADO PARA AS FORMULAÇÕES COM 3,4 E 5 DIAS DE FERMENTAÇÃO PARA A DILUIÇÃO 1:6 DE MEL DE EUCALIPTO	44

Índice de Tabelas

TABELA 1: COMPOSIÇÃO DO MEL	8
TABELA 2: VALOR NUTRICIONAL DO MEL	9
TABELA 3: CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO PROELIF®.....	16
TABELA 4: QUANTIDADES UTILIZADAS NAS DILUIÇÕES E RESPECTIVOS DIAS DE FERMENTAÇÃO	19
TABELA 5: QUANTIDADES UTILIZADAS NAS DILUIÇÕES E RESPECTIVOS DIAS DE FERMENTAÇÃO	20
TABELA 6: QUANTIDADES UTILIZADAS NAS DILUIÇÕES E RESPECTIVOS DIAS DE FERMENTAÇÃO	21
TABELA 7: GRAMAS DE MEL POR 10 ML DO MESMO.....	25
TABELA 8: PERCENTAGENS DOS CONSTITUINTES DAS DILUIÇÕES 1:6 E 1:8 PARA TODOS OS MÉIS UTILIZADOS AO LONGO DO ESTUDO	26
TABELA 9: PERCENTAGENS TOTAIS MÉDIAS DE CADA AÇÚCAR PARA TODOS OS MÉIS UTILIZADOS AO LONGO DO ESTUDO	26
TABELA 10: FORMULAÇÕES FINAIS ESCOLHIDAS E RESPECTIVOS CÓDIGOS PARA PROVA AO CONSUMIDOR	41

1. Introdução

Com o fim de adquirir o grau de mestre em Engenharia Alimentar, na especialização “Processamento de Alimentos”, foi desenvolvido um trabalho experimental para a produção de uma bebida alcoólica produzida a partir do mel.

A ideia de produzir uma bebida inovadora proveio da Professora Catarina Prista juntamente com a empresa “Serra Mel” com o intuito de dar vazão ao excesso de produção de mel, produzindo simultaneamente um produto de maior valor acrescentado. Para tal foi utilizado um processo semelhante ao da produção de espumante de vinho utilizando como substrato soluções diluídas de mel.

1.1. Enquadramento teórico

1.1.1. Economia e *Marketing*

Devido à globalização da economia, o desenvolvimento de novos produtos tornou-se essencial para o sucesso das empresas na indústria alimentar. Começou a ser necessária a análise o mercado e a constante inovação nos bens oferecidos ao consumidor. Tal facto deveu-se maioritariamente ao aumento do poder de compra dos consumidores, que cada vez mais procuram satisfazer as suas necessidades e preferências, mas também ao aumento da exigência do nível de qualidade e segurança da indústria.

Porém, o desenvolvimento de novos produtos é um processo complexo, que exige uma estreita relação entre a administração da empresa, a equipa de pesquisa e desenvolvimento e os setores de *marketing*, produção, controle de qualidade e vendas, consumidores e fornecedores.

De modo a minimizar o risco no desenvolvimento/lançamento de novos produtos no mercado foram criados uma série de modelos. O primeiro foi o modelo *Booz, Allen e Hamilton (BAH)*, publicado em 1982. Este modelo distingue-se por representar o fundamento de todos os outros modelos que foram desenvolvidos a partir daí. Este modelo baseia-se em 7 passos essenciais ilustrados na *Figura 1*.^[1]



FIGURA 1: ESQUEMATIZAÇÃO DO MODELO BOOZ

Outro modelo muito utilizado atualmente no desenvolvimento de novos produtos é o *Stage-Gate* desenvolvido em 1985 por *Robert G. Cooper*.

Cada etapa é projetada para reunir informações específicas que ajudam no avançar do projeto para a próxima fase/ponto de decisão. Esta recolha de informações tem como principal objetivo reduzir progressivamente a incerteza e risco, sendo que ao longo do processo as fases vão sendo cada vez mais dispendiosas.

Este modelo pode ser dividido em 7 etapas^{[1][2]}:

Etapa 1 – Estratégia de desenvolvimento de novos produtos: começa com o desenvolvimento de novas estratégias de produto. Estabelecem-se as bases para o novo processo de produção, revendo os objetivos associados e identificando as funções que os novos produtos podem desempenhar na satisfação das diretivas.

Etapa 2 – Geração da ideia: baseia-se numa pesquisa que pretende verificar se as ideias de produtos são compatíveis com as metas e objetivos determinados na etapa anterior. Começa geralmente pela realização de uma autoavaliação direcionada a determinar as principais categorias do produto e possibilidades de desenvolvimento. As ideias podem surgir por parte de todos os colaboradores, clientes e fornecedores. O propósito final desta fase é a geração de uma vasta gama de ideias sendo que cada uma delas deve ser ponderada e dada como executável.

Etapa 3 – Triagem e avaliação: envolve a análise de todas as ideias geradas na fase anterior para determinar quais as merecedoras de posterior desenvolvimento. Pretende-se diminuir o número de ideias geradas durante a etapa precedente,

elegendo as que oferecem mais vantagens, tendo em conta, evidentemente o lucro associado à sua produção. Análise que se prolonga nas restantes etapas do processo.

Etapa 4 – Análise de negócios: as ideias mais promissoras são submetidas a um escrutínio intenso com o fim de determinar se estas se vão traduzir em ofertas viáveis. Elaboram-se vários planos de negócio possíveis que reconhecem os atributos do produto, barreiras à sua entrada no mercado, potenciais e atuais concorrentes, mercados-alvo, informações acerca do crescimento do mercado, projeções financeiras e métodos de promoção.

Etapa 5 – Desenvolvimento: as ideias que resistiram à eliminação preliminar serão convertidas em produtos. Este desenvolvimento envolve a montagem de todos os componentes necessários para a oferta de serviços, tais como espaço de escritório, equipamentos, licenças de funcionamento e pessoal. Durante esta etapa, passagem do papel para a realidade, os novos produtos podem e tendem a passar por diversas alterações. As alterações prosseguem ao longo das restantes etapas de modo que os novos produto/serviços estejam adequados ao mercado.

Etapa 6 – Teste: tem como principal objetivo validar as projeções anteriores através da experimentação. Os novos produtos são preparados para entrar no mercado através da realização de ensaios para determinar a adequação ao mesmo, a natureza do teste está dependente das características dos produtos em fase de desenvolvimento e do alvo. Depois de todas as alterações necessárias, os produtos estarão prontos a comercializar.

Fase 7 – Comercialização: é nesta fase que se dá a introdução no mercado. À medida que os novos produtos entram no mercado, deve-se garantir que estes cumprem as expectativas dos consumidores e valorizar o seu *feedback*. Quaisquer *bugs* nos novos produtos devem ser identificados e rapidamente corrigidos.

A inovação na indústria pode ocorrer de várias maneiras ^{[4] [5] [6]}:

- Inovação do produto – introdução no mercado de novos (ou melhorados) produtos. Inclui alterações significativas nas suas especificações técnicas, e materiais.
- Inovação do processo – implementação de novos processos de produção ou logística de bens ou serviços. Inclui alterações significantes de técnicas ou equipamentos.

- Inovação organizacional – atualização dos métodos organizacionais a níveis contractuais e relações externas.
- Inovação de *marketing* – execução de novos métodos de *marketing*, envolvendo melhorias no *design* do produto ou embalagem, preço, distribuição e promoção dos mesmos.

1.1.2. Vinho espumante

O termo espumante aplica-se a vinhos cuja efervescência resulta de uma fermentação alcoólica que ocorre num recipiente fechado. A produção de um espumante encontra-se dividida em duas grandes fases: a primeira é a vinificação do vinho base e a segunda é a espumantização. Há duas formas de produzir vinhos espumantes: o chamado “Método Clássico” ou “Método de *Champenoise*” (dióxido de carbono resulta de fermentação natural, quando feita dentro da garrafa) e o “Método *Charmat*” (no qual a fermentação ocorre fora da garrafa) ^{[7][8]}.

1.1.2.1. Características desejadas num vinho espumante

Com vista a obter um vinho espumante com boas características é necessário que este apresente as seguintes características:

- Prova organolética perfeita – sem oxidação, aroma limpo e fresco.
- Teor alcoólico baixo – 9,5 a 11,5 % vol.
- Acidez elevada – acidez total $\geq 6,5$ g/L (ácido tartárico).
- Baixo teor de dióxido de enxofre: SO_2 Livre ≤ 15 mg/L e SO_2 Total ≤ 100 mg/L.
- Baixo teor de CO_2 – muitas vezes existe a necessidade de descarbonatação em vinhos espumantes novos, isto faz-se através da passagem por uma corrente de azoto.
- Baixo teor de etanol.

1.1.2.2. Etapas de produção (método clássico)

Em relação ao método clássico, existem várias etapas que o caracterizam ^{[7][8]}:

Colheita – para se obter um vinho com um grau alcoólico baixo, que possibilite uma fermentação dentro da garrafa e uma frescura ácida (determinante para o equilíbrio do produto final), há que vindimar as uvas ainda em estado de submaturação.

Prensagem – para evitar fenómenos de maceração, as uvas não devem ser esmagadas, devendo entrar inteiras na prensa. Idealmente, a prensa a utilizar nesta operação é a prensa pneumática de membrana que permite uma grande suavidade na extração e uma perfeita separação do mosto nas várias frações. O fracionamento do mosto obtido na prensagem é, por isso, fundamental para a obtenção do vinho ideal para a espumantização. À medida que se aumenta a pressão, os mostos resultantes perdem acidez, havendo em simultâneo um aumento dos compostos fenólicos. Consequentemente, a intensidade aromática e a elegância no espumante final ficam comprometidas.

Inativação – os mostos destinados à elaboração do vinho base para o espumante são extremamente sensíveis à oxidação, assim, a inertização é crucial uma vez que a quantidade de sulfuroso (antioxidante) que é permitido utilizar é muito reduzida. A partir do momento em que se dá o esmagamento e o mosto entra em contacto com o ar deve-se garantir que a atmosfera que o rodeia contenha o mínimo de oxigénio possível. Para tal, tenta-se substituir o ar desta atmosfera envolvente por um gás que evite oxidações – usualmente utiliza-se dióxido de carbono sólido (que sublima, ocupando a atmosfera e substituindo o oxigénio), gelo seco ou neve carbónica (a - 77°C) que tem como vantagem extra ajudar na refrigeração do mesmo. Este processo deverá ser garantido até que se inicie a fermentação alcoólica, nessa etapa dá-se a produção CO₂ gasoso e o mosto passa a estar protegido da oxidação.

Choque térmico – consiste em baixar a temperatura do mosto para os valores desejados, evitando que as enzimas oxidativas e os microrganismos entrem em funcionamento, de modo a facilitar o processo de clarificação.

Tiragem da garrafa – processo através do qual se engarrafa o vinho base misturado com um licor de tiragem e levedura ativa. O licor é uma solução com elevada concentração de açúcar que vai dar origem a uma pressão interna entre os 5 e os 6

bar durante a fermentação no interior da garrafa e consequente produção de CO₂.

Fermentação alcoólica dentro da garrafa – após a tiragem, as garrafas são encapsuladas com a vulgar cápsula de coroa e colocadas na horizontal. Para esta fase escolhe-se o período mais frio do ano (Janeiro) para que a fermentação demore cerca de um a dois meses (10°C a 12°C). Estas condições garantem uma fermentação lenta e regular, muito importante para a qualidade do produto final.

Envelhecimento na garrafa sobre o depósito de leveduras – assim que o açúcar for totalmente consumido e a pressão interior estiver entre os 5 e 6 bar, o vinho (já efervescente) deverá ser sujeito a um estágio de contacto com o depósito de leveduras que se formou no fundo das garrafas deitadas. Durante este processo dá-se a autólise das leveduras que ao morrerem, rebentam e libertam para o meio substâncias que aumentam a qualidade do espumante.

Remuage – com a aproximação da data de colocar o espumante no mercado, há que garantir que o depósito de leveduras é integralmente removido. Para tal, tradicionalmente as garrafas eram rodadas e progressivamente colocadas na posição vertical invertida, para que o depósito se fosse aproximando do topo do gargalo (este processo demorava aproximadamente 1 mês). Atualmente este processo realiza-se numa semana em *giro paletes* que simulam a *remuage* antiga mas que permitem que se poupe tempo, espaço e mão-de-obra.

Dégorgement – já com o depósito no fundo do gargalo, em contacto com a cápsula de coroa, há que realizar o *dégorgement*, este processo consiste em retirar a cápsula e o depósito, num movimento só. Atualmente utiliza-se o método de congelação, neste processo congela-se a parte superior do gargalo onde está depositado todo o sedimento, depósito esse que é expulso aquando da abertura da cápsula, ficando o espumante pronto a ser atestado e rolhado.

Após o *dégorgement*, tal como foi referido anteriormente, a garrafa tem de ser atestada, dada a perda de algum volume inerente à fase anterior do processo. Embora haja casos em que o atesto é feito apenas com o próprio vinho proveniente de outras garrafas, geralmente utiliza-se um "licor de expedição" que contém açúcar, sulfuroso e ácido ascórbico para eliminar o oxigénio que se dissolveu durante a fase anterior.

Todas estas etapas tornam o processo moroso e dispendioso, sendo a etapa de *Remuage* a etapa mais longa. Uma das alternativas para reduzir significativamente o duração desta etapa consiste na utilização de levedura imobilizada em matriz gelatinosa. Em Portugal este tipo de levedura é comercializado pela empresa Proenol na forma de Proelif®, levedura imobilizada em dupla camada de alginato de cálcio. Desta forma é possível não só reduzir o tempo de *Remuage*, como também acelerar o processo da segunda fermentação em garrafa uma vez que permite a utilização de uma elevada concentração de células.

1.1.3. Mel

O mel é um alimento geralmente encontrado em estado líquido, produzido pelas abelhas a partir do néctar de flores e processado pelas enzimas digestivas desses insetos – invertase, diastase, glucose oxidase, catalase e fosfatase – sendo armazenado nas colmeias (em favos), servindo posteriormente de alimento às mesmas^[9].

O mel é utilizado pelo homem como alimento desde os seus primórdios. Inicialmente era obtido através de uma extração nefasta para as colmeias. Com passar dos séculos, o ser humano desenvolveu as técnicas de manejo, até extrair o mel sem danificar a colmeia, o que, evidentemente gerou um aumento da produção. A captura de enxames e a sua instalação em colmeias artificiais marca o início da apicultura. Com esta "domesticação" temos então o início da apicultura^[9].

A bebida existente produzida a partir do mel denomina-se hidromel, este produto tem um teor alcoólico que varia entre 5%vol e 14%vol. Existem relatos do seu consumo já em culturas antigas tais como a grega, celta, saxões e viking.

1.1.3.1. Variedades de mel

Existem dezenas de variedades de mel que podemos obter a partir de diferente flora, técnicas de preparação ou espécies de abelhas. Estas variações refletem-se na cor, no aroma e no sabor do mel^[10].

A sua cor e sabor estão diretamente relacionadas com a predominância da flora utilizada para a sua produção. Por exemplo, os méis de coloração clara apresentam sabor e aroma mais suaves (laranjeiras e rosmaninhos). Por outro lado, os méis de

coloração escura (como por exemplo o de urze ou eucalipto) são mais nutritivos, ricos em proteínas e sais minerais.

No que diz respeito ao néctar, este pode provir de um único tipo de flor (mel monofloral) ou de várias (mel plurifloral ou multifloral).

1.1.3.2. Composição

O mel é constituído na sua maioria por hidratos de carbono (cerca de 75%), nomeadamente por açúcares simples ou monossacáridos (glucose e frutose). As características físicas do mel, tais como a viscosidade, densidade, higroscopicidade e capacidade de cristalização estão relacionadas principalmente com as diferentes concentrações de açúcares. O mel é também composto por água (aproximadamente 20%), minerais (cálcio, cobre, ferro, magnésio, fósforo, potássio, entre outros), aminoácidos, ácidos orgânicos (ácido acético, cítrico, entre outros) e por vitaminas do complexo B, vitamina C, D e E. O mel possui ainda um teor considerável de antioxidantes. O pH apresenta-se em média com valores próximos de 3,91.^{[11][12]}

TABELA 1: COMPOSIÇÃO DO MEL^[12]

Composição do mel			
Componentes	Média	Desvio padrão	Variação
Água (%)	18,5	1,46	13,4 ~ 22,9
Frutose (%)	38,19	2,07	27,25 ~ 44,26
Glucose (%)	31,28	3,03	22,03 ~ 40,75
Sacarose (%)	1,31	0,95	0,25 ~ 7,57
Maltose (%)	7,31	2,09	2,74 ~ 15,98
Azoto (%)	0,041	0,026	0,00 ~ 0,133

TABELA 2: VALOR NUTRICIONAL DO MEL (FONTE: INSTITUTO RICARDO JORGE)

Valor nutricional do mel (por 100g)	
Energia	1330 kJ / 314 kcal
Proteína	0,5 g
Hidratos de Carbono	78 g
Sal	30 mg
Água	18,5 g
Niacina	0,3 mg
Vitamina B6	0,2 mg
Potássio (K)	51 mg
Sódio (Na)	12 mg
Fósforo (P)	10 mg
Magnésio (Mg)	2 mg

1.1.3.3. Etapas de produção

Apesar de o mel ser produzido pelas abelhas, existe um conjunto de etapas a seguir para que o mel chegue a nossas casas tal como o conhecemos.

Logo após serem retirados os quadros do apiário a extração ocorre sobre estrados de madeira ou material plástico. É de realçar que os quadros não devem ter acesso à área de manipulação, visto serem provenientes do campo, podendo assim contaminar o local).

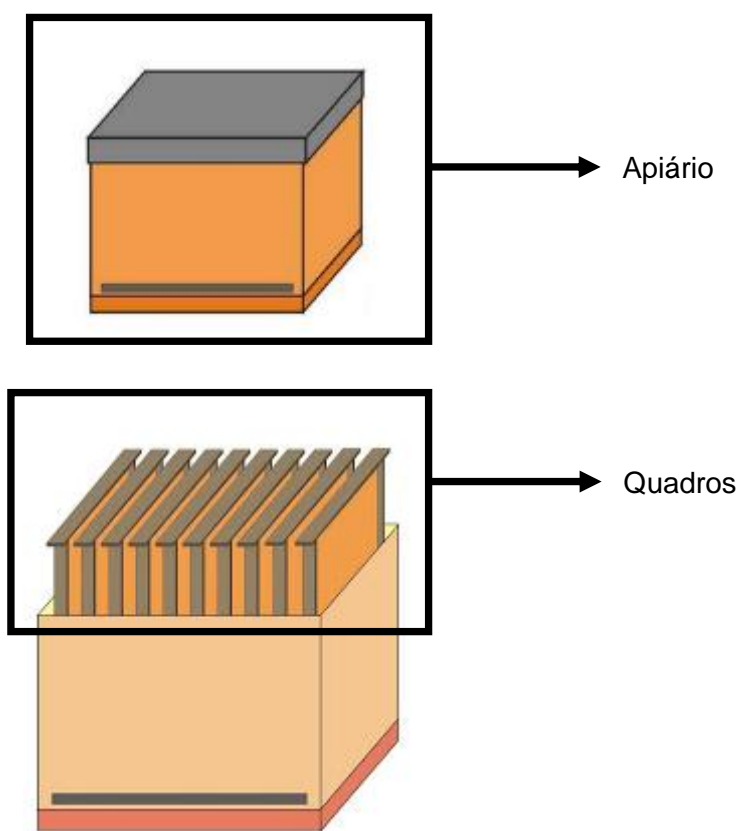


FIGURA 2: APIÁRIO E CONSTITUINTES INTERNOS

Esta extração é também chamada de desoperculação dos favos, etapa em que se dá a centrifugação dos quadros. Depois de extraído, o mel é retirado da centrifugadora pela ação da gravidade (escoando para baldes) ou por sistema de bombeamento (diretamente para o decantador). Independentemente da alternativa escolhida, o processo seguinte denomina-se filtragem, processo no qual se utilizam várias peneiras (decrecendo a abertura das mesmas). Terminada a filtragem o mel segue para o decantador, onde ficará em repouso durante 48 horas, permitindo que bolhas e

possíveis partículas que não foram retiradas na filtragem, possam finalmente ser eliminadas.^[9]

1.1.4. Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é um processo biológico no qual se dá a conversão de açúcares, tais como a glucose (também denominada por glicose), frutose e sacarose, em energia celular, tendo como produtos secundários a produção de etanol e dióxido de carbono.

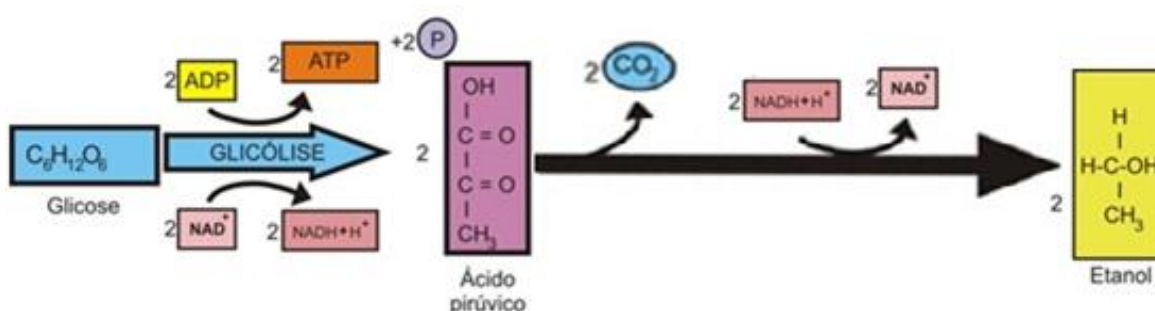
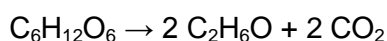


FIGURA 3: ESQUEMA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

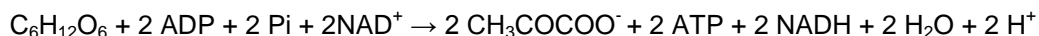
A primeira etapa da fermentação alcoólica denomina-se glicólise. Neste processo uma molécula de glucose divide-se em dois piruvatos (ou ácido pirúvico). A energia produzida a partir desta reação (exotérmica) é usada na ligação dos fosfatos inorgânicos (Pi), convertendo ADP e NAD^+ em ATP e NADH, respetivamente. Os dois piruvatos são então descarboxilados pela enzima piruvato descarboxilase, de modo a formar dois acetaldeídos e duas moléculas de CO_2 (produto residual). Os dois acetaldeídos são, por fim, convertidos em duas moléculas de etanol, utilizando os iões H^+ a partir de NADH (voltando a converter o NADH em NAD^+).^{[16][17]}

1.1.4.1. Etapas do processo bioquímico

As equações químicas abaixo resumem a fermentação de glucose em etanol. A fórmula química geral para a fermentação alcoólica é:



No primeiro passo cada molécula de glucose é dividida em duas moléculas de piruvato num processo denominado por glicólise:



Tal como mostra a equação da reação, a glicólise provoca a redução de duas moléculas de NAD^+ em NADH . Sendo que também são convertidas duas moléculas de ADP em duas de ATP.^{[16][18]}

Na segunda e terceira etapa da fermentação alcoólica, as duas moléculas de piruvato produzidas são convertidas em etanol, com a libertação de duas moléculas de CO_2 e regeneração do NAD^+ .

1.1.5. Microrganismos

1.1.5.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae é a espécie de levedura geralmente utilizada no processo de fabrico de cerveja e vinho. Esta espécie de levedura foi o primeiro genoma eucariótico a ser completamente sequenciado. Esta espécie tem sido usada desde há milhares de anos na produção de cerveja sendo que o registo mais antigo conhecido da utilização desta levedura na fermentação de uma bebida remonta a 7000 A.C na China. Pode ser encontrada na superfície de frutas e plantas, no solo, trato gastrointestinal e superfície da pele de animais e tem geralmente uma temperatura de fermentação ótima varia entre 15-20 °C. Outros tipos de leveduras, como por exemplo a *Saccharomyces Pastorianus*, são capazes de fermentar eficientemente a uma temperatura inferior (10 °C).^{[13][15]}

1.1.5.2. Estrutura celular

À semelhança de outros eucariontes, *Saccharomyces cerevisiae* contém organelos, tais como mitocôndrias, núcleo, e vacúolos, limitados pela membrana. Os 17 cromossomas que esta levedura contém encontram-se armazenados no núcleo. Pode realizar tanto a respiração aeróbia como a anaeróbia, sendo que a fermentação é realizada no citosol quando existe pouco ou nenhum oxigénio presente e uma

quantidade considerável de açúcares fermentáveis. Estes açúcares são convertidos em etanol e dióxido de carbono.^[15]

1.1.5.3. Imobilização celular (IC)

As primeiras pesquisas acerca da imobilização de células microbianas surgiram no momento em que se começou a observar a capacidade de alguns microrganismos em se fixarem naturalmente a superfícies de diferentes ambientes. A colonização da superfície por formação de biofilmes é uma estratégia de sobrevivência das bactérias podendo ocorrer naturalmente, como no caso das bactérias formadoras da cárie.^[19]

O estado morfológico do microrganismo durante o processo fermentativo influencia diretamente a quantidade de produtos microbianos de interesse, através da redução do tempo de cultivo e do aumento da produtividade devido à elevada concentração de células. Ou seja, quanto maior a concentração de células microbianas no suporte, maior a síntese dos metabolitos e, obviamente, maior a eficiência da fermentação.^[20]

Uma das alternativas encontradas para organizar a estrutura morfológica destes microrganismos foi a imobilização celular (IC), preservando a atividade catalítica desejada, utilizada tanto a uma escala de laboratório como industrial. A IC consiste no confinamento físico das células num espaço definido. As suas atividades catalíticas são mantidas, neste espaço, em processos de operação contínua ou descontínua possibilitando a reutilização das mesmas. O aprimoramento de novas técnicas de IC tem possibilitado uma maior longevidade aos suportes destas células, o que permite realizar a fermentação em condições adversas de pH.

As técnicas de IC podem ser divididas em naturais (nomeadamente, formação de biofilmes e a adesão/adsorção microbiana em suportes sintéticos ou naturais) e artificiais (encapsulação em matrizes como alginato de cálcio ou uso de agentes ligantes).

As desvantagens do processo de imobilização incluem: as limitações de transferência de massa, que podem afetar o crescimento celular; o custo do processo de produção; bem como, o possível rompimento da matriz utilizada devido ao crescimento celular e evolução de gases.^[21]

1.1.5.4. Fatores que influenciam a atividade enzimática

Existem diversos fatores que condicionam/determinam a atividade metabólica das leveduras:

Temperatura – todas as enzimas encontram-se ativadas num determinado intervalo de temperatura, dentro desse intervalo a atividade enzimática aumenta, dado que as colisões entre o substrato e o centro ativo da enzima se tornam cada vez mais frequentes.

A atividade enzimática é máxima à temperatura ótima. Acima dessa temperatura a atividade enzimática diminui rapidamente, uma vez que a agitação térmica dos átomos desestabiliza as ligações químicas e a conformação da molécula altera-se. A enzima sofre a desnaturação, o que corresponde a uma perda de atividade biológica permanente.

Ao contrário das temperaturas elevadas, as baixas temperaturas causam a inativação das enzimas, mas não as destroem, e a atividade é retomada em meios cujos valores de temperatura são mais elevados.

A maioria das enzimas humanas tem uma temperatura ótima de atuação de 37°C.

pH – as enzimas têm um pH ótimo de atuação, acima e abaixo do qual a sua atividade acaba por cessar. O pH do meio influencia a conformação do centro ativo da enzima e, conseqüentemente, a sua interação com o substrato. Nas enzimas humanas, o pH ótimo está relacionado com o pH do meio em que atuam.

Concentração de substrato – o aumento da concentração de substrato é acompanhada pelo aumento da atividade enzimática, desde que haja enzima disponível.

No entanto, para uma concentração fixa de enzima, a atividade enzimática aumenta com a concentração do substrato até se atingir a saturação da enzima (todos os centros ativos estão ocupados) e depois a atividade enzimática estabiliza, uma vez que a taxa de formação de novas ligações ao substrato é igual à taxa de separação dos produtos.

O traçado do gráfico da velocidade de reação em função da concentração do substrato é uma semiparábola com a concavidade voltada para baixo, como é possível observar na representação abaixo.

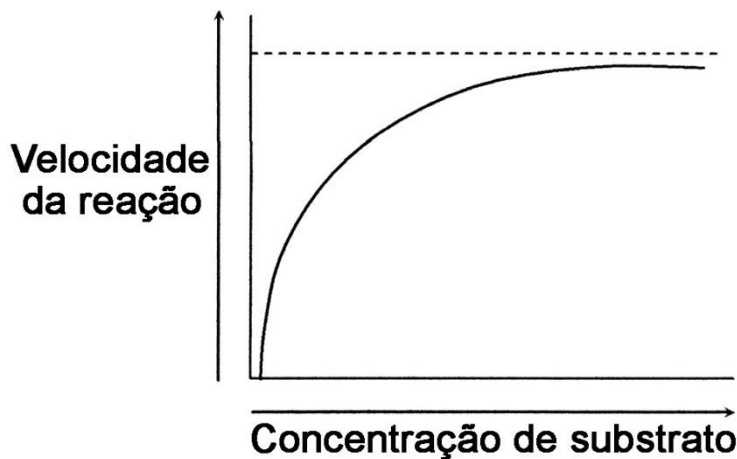


FIGURA 4: SIMPLIFICAÇÃO DE UM GRÁFICO DA VELOCIDADE DE REAÇÃO DA ENZIMA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO

Para as enzimas alostéricas, mediante um aumento pouco significativo da concentração de substrato, a atividade da enzima não sofre alterações de destaque, mas, com a quantidade de substrato a aumentar progressivamente, aumenta as ligações do substrato a algumas subunidades o que leva a modificações na estrutura das enzimas, facilitando a ligação do substrato aos centros ativos.

Para as enzimas alostéricas o traçado é diferente, e aparece com uma forma sigmoidal (S).

Concentração de enzima - aumentando a concentração da enzima, aumenta a velocidade da reação, desde que haja substrato disponível.

Presença de inibidores - a presença de inibidores diminui a atividade enzimática. Os efeitos dependem do tipo de inibição.

- Inibição irreversível – o aumento da concentração de inibidor é acompanhada pela diminuição da atividade enzimática, uma vez que os centros ativos da enzima vão ficando permanentemente ocupados.
- Inibição reversível competitiva – o aumento da concentração de substrato permite aumentar a atividade enzimática, dado que cada vez mais centros ativos passam a ser ocupados pelo substrato.
- Inibição reversível não competitiva – a atividade enzimática diminui com o aumento da concentração do inibidor e o aumento da concentração do substrato não tem qualquer efeito.

1.2. Objetivos

Dada a crescente procura dos consumidores por novos produtos alimentares, com este estudo pretende-se a obtenção de uma nova bebida concebida com base no método de produção do vinho espumante, apresentando, no entanto, algumas alterações a nível do processo. Neste estudo é também utilizado um alimento base diferente, ou seja o mel, sendo que a sua percentagem de açúcares é igualmente elevada.

Pretende-se valorizar o produto base através da apresentação de uma aplicação/forma de comercialização do mel inovadora, que visa o escoamento do excesso do produto por parte da indústria, outra meta é caracterizar a nível químico e físico a bebida produzida e avaliar a aceitação deste novo produto por parte dos consumidores.

2. Material e Métodos

2.1. Microrganismo

Os microrganismos utilizados neste estudo foram leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, facultadas pela empresa Proenol. Estas leveduras são imobilizadas em alginato de cálcio e desidratadas para inoculação direta. O ProElif®, nome dado pela empresa a este produto, apresenta-se sobre a forma de esferas com cerca de 2mm de diâmetro. As características analíticas do ProElif® estão expostas adiante (tabela 4).

TABELA 3: CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO PROELIF® (DA SEGUNDA À SEXTA LINHA OS VALORES SÃO REFERENTES À MATÉRIA SECA)

Parâmetros	Especificações
Sólidos	>86%
Metais pesados (expresso em chumbo)	<10 mg/kg
Arsénio	<3 mg/kg
Chumbo	<5 mg/kg

Cádmio	<1 mg/kg
Mercúrio	<2,4 mg/kg
Leveduras viáveis	>10 ⁹ ufc/g
Bactérias aeróbias mesófilas	<10 ³ ufc/g
Bolores	<10 ³ ufc/g
Coliformes	<10 ufc/g
E.coli	Ausência em 1 g

2.2. Bebida base a fermentar

2.2.1. Preparação da diluição

Sabendo-se de antemão que o mel contém entre 65-75% de açúcares totais decidiu-se começar por diluir o mesmo 1:3, ficando assim com uma concentração de açúcares idêntica ao mosto de uva que dá origem aos espumantes de vinho (20%). Para tal começou-se por adicionar ao mel o volume apropriado de água desmineralizada previamente aquecida numa cafeteira elétrica convencional. Esta etapa facilitava a diluição, sendo mais fácil homogeneizar a solução. Este processo foi efetuado para todas as diluições ao longo do estudo, sendo que consoante a diluição, foram adicionados diferentes volumes de água desmineralizada em substituição do mel.

2.2.2. Filtração da diluição

Para esta etapa foi escolhida a filtração esterilizante: neste processo o vácuo criado no sistema aumenta a velocidade de passagem do líquido pelo papel (filtro). Outra razão para a escolha deste processo, foi a necessidade de realizar uma microfiltração, obtendo-se assim uma retenção de microrganismos que poderiam contaminar a nossa bebida base.

Começou-se por filtrar à temperatura ambiente, inicialmente com filtros de 1,2 µm, seguida de uma filtração a 0,45 µm. Supostamente, efetuar-se-ia uma terceira

filtração, a 0,22 μm , mas tal não se sucedeu visto ter-se constatado que tal processo demoraria demasiado tempo. Por outro lado, como se pode observar na figura 5 optou-se por ir limpando os filtros cuidadosamente com uma espátula com o objetivo de remover o excesso de mel que nele se acumulava, bem como trocar o filtro quando se observava que o fluxo de filtrado se começava a tornar muito reduzido.

Com o avançar do estudo foi possível também concluir que um pré-aquecimento (aproximadamente 50°C) da bebida base levava a uma mais rápida filtração.



FIGURA 5: FILTROS OBSTRUÍDOS AO LONGO DA FILTRAÇÃO JUNTAMENTE COM ESPÁTULA PARA LIMPAR OS MESMOS (DURANTE A SUA UTILIZAÇÃO)

2.3. Processo fermentativo

2.3.1. Ensaios preliminares

Nesta primeira abordagem, os primeiros méis testados foram os de rosmaninho e urze nas diluições 1:3, 1:4, 1:6 e 1:8 (20%, 15%, 10% e 7,5% de açúcares, respectivamente) – Tabela 5, cada diluição foi reproduzida em duplicado com o objetivo de fermentar ao longo de dois períodos diferentes – 3 e 15 dias.

Utilizaram-se frascos de vidro de 100 mL para “engarrafar” os espumantes, foram adicionados 80 mL de cada diluição e inoculou-se com 1,5 mL de células.

Os frascos foram colocados na vertical em banho-maria (25°C), convém realçar que os primeiros foram retirados ao fim de 3 dias e os segundos ao fim de 15 dias.



FIGURA 6: BANHO TERMOSTÁTICO DIGITAL

No fim do período de incubação, os frascos foram colocados a 4°C de modo a manter a temperatura de consumo ideal bem como parar a fermentação dos espumantes.

TABELA 4: QUANTIDADES UTILIZADAS NAS DILUIÇÕES E RESPECTIVOS DIAS DE FERMENTAÇÃO

Diluição	mL de Mel	mL de água desmineralizada	Dias de fermentação
1:3 Mel de Rosmaninho	66,67	133,33	3 e 15
1:4 Mel de Rosmaninho	50	150	3 e 15
1:6 Mel de Rosmaninho	33,33	166,67	3 e 15
1:8 Mel de Rosmaninho	25	175	3 e 15
1:3 Mel de Urze	66,67	133,33	3 e 15
1:4 Mel de Urze	50	150	3 e 15
1:6 Mel de Urze	33,33	166,67	3 e 15
1:8 Mel de Urze	25	175	3 e 15

Foram retiradas amostras de 2 mL de cada diluição para analisar posteriormente no HPLC, quer ao engarrafar (0 dias), quer ao fim dos 3 ou 15 dias de fermentação.

2.3.2. Ensaios de fermentação

No segundo ensaio e após as provas dos espumantes obtidos (referidas posteriormente), prepararam-se as bebidas à base de urze, eucalipto e multifloral de Lafões nas diluições 1:6 e 1:8, em três tempos diferentes, sendo estes 2 dias (48h) 3 dias (72h) e 4 dias (96h). Nesta tentativa já não se fez as concentrações 1:3 e 1:4. Nesta etapa, todas as amostras engarrafaram-se em garrafas de vidro de 200 mL e seguidamente seladas com cápsulas coroa, ao contrário da etapa anterior, isto porque se observaram fugas de gás nos ensaios preliminares.

Foram precisos 320 mL de cada concentração (1: 6 e 1:8) de cada tipo de mel – urze, eucalipto e multifloral de Lafões – para fermentar durante os três tempos diferentes (80 mL x 3 tempos) e o branco para cada tipo de mel (80 mL).

Na tabela 6 estão representadas as bebidas base utilizadas nesta tentativa bem como as respectivas diluições.

TABELA 5: QUANTIDADES UTILIZADAS NAS DILUIÇÕES E RESPECTIVOS DIAS DE FERMENTAÇÃO

Diluição	mL de Mel	mL de água desmineralizada	Dias de fermentação
1:6 Mel de Urze	53,3	266,6	2, 3 e 4
1:8 Mel de Urze	40	280	2, 3 e 4
1:6 Mel de Eucalipto	53,3	266,6	2, 3 e 4
1:8 Mel de Eucalipto	40	280	2, 3 e 4
1:6 Mel de Multi. De Lafões	53,3	266,6	2, 3 e 4
1:8 Mel de Multi. De Lafões	40	280	2, 3 e 4

2.3.3. Ensaios de fermentação com mel caramelizado

Com vista a testar a produção de espumante de mel caramelizado com mel caramelizado de urze, visto que foi disponibilizado em maior quantidade. Para tal partiu-se de 200 mL de mel adicionando-se 300 mL de H₂O. Esta mistura foi aquecida durante 45 min perfazendo um total de volume evaporado de 100 mL, obtendo-se assim um volume final de 400 mL. Desse volume final preparam-se duas diluições, uma a 1:6 (800 mL) e outra a 1:8 (1 L), ambas fermentaram ao longo de 3 dias. Para além do espumante de mel caramelizado, foi também reproduzida parte da 2ª tentativa: refizeram-se as diluições 1:6 e 1:8 para os três tipos de mel, mas

fermentados apenas durante 3 dias. Esta repetição deveu-se à deficiência sensorial notada nas diluições anteriores. Cada diluição, e respectivos dias de fermentação, foram replicados três vezes.

TABELA 6: QUANTIDADES UTILIZADAS NAS DILUIÇÕES E RESPECTIVOS DIAS DE FERMENTAÇÃO

Diluição	mL de Mel	mL de água desmineralizada	Dias de fermentação
1:2 Mel de Urze caramelizado	200	300 (antes do aquecimento)	-
1:6 Mel de Urze caramelizado	200	600	3
1:8 Mel de Urze caramelizado	200	800	3
1:6 Mel de Urze	53,3	266,6	3
1:8 Mel de Urze	40	280	3
1:6 Mel de Eucalipto	53,3	266,6	3
1:8 Mel de Eucalipto	40	280	3
1:6 Mel de Multi. De Lafões	53,3	266,6	3
1:8 Mel de Multi. De Lafões	40	280	3

2.4. Tratamento das amostras - HPLC

2.4.1. Preparação das amostras

Ao longo do estudo foram recolhidas várias amostras, tal como foi referido acima, antes e depois de se dar a fermentação das diluições. Estas amostras (2 mL) foram analisadas a nível da concentração de glucose, frutose, ácido acético e etanol por HPLC.

A amostragem baseia-se em retirar 2mL com uma micropipeta para *eppendorfs* (2mL). As amostras recolhidas foram centrifugadas (12000 rpm, 2 min) com o objetivo de sedimentar e remover resíduos sólidos, sendo que o líquido foi transferido para outro eppendorf e posteriormente armazenado no frio (5°C).

Após juntar-se uma razoável quantidade de amostras procedeu-se à segunda fase do seu tratamento. Nesta segunda fase, dos 2 mL armazenados de cada amostra é retirado um volume de 1mL (armazenou-se o restante de forma a precaver possíveis

falhas no processo). Transpôs-se o tratamento das amostras para a *hotte* e colocou-se o volume retirado num *eppendorf*, posteriormente adicionou-se 30µL de ácido perclórico (10%(v/v)). Após a adição do ácido, os tubos são colocados em gelo durante 30 minutos, sofrendo de seguida uma segunda centrifugação (12000 rpm, 10 min) na qual o sobrenadante é recolhido. Por fim, filtraram-se as amostras com uma seringa de filtração, na qual se colocou uma membrana de nitrocelulose (poro de 0,22µm). O conteúdo é filtrado para o interior de *vials* (Figura 7) ficando assim pronto para ser inserido no amostrador do HPLC.

Todas as amostras foram tratadas através do procedimento acima descrito bem como as soluções para a construção das curvas de calibração.



FIGURA 7: SERINGA DE FILTRAÇÃO E SUPORTE PARA FILTRO (ESQUERDA) E VIAL (DIREITA)

2.4.2. Curvas de calibração

Previamente à análise das amostras tratadas, prepararam-se soluções padrão de vários compostos (glucose, frutose, ácido acético e etanol) para a elaboração de curvas de calibração, tendo em conta os componentes que seriam de esperar antes e depois da fermentação, para posteriormente ser possível determinar as concentrações dos mesmos. Prepararam-se soluções padrão de glucose entre 0,025%(p/v) e 8%(p/v), de frutose entre 0,25%(p/v) e 10%(p/v), ácido acético entre 0,25%(p/v) e 10%(p/v) e etanol entre 0,25%(v/v) e 10%(v/v).

2.4.3. Preparação do eluente

O eluente corresponde à fase móvel, sendo uma espécie de solvente, diz-se “uma espécie” porque interage com as amostras promovendo a separação dos seus componentes, não dissolvendo ou reagindo com as amostras. Para se proceder à análise no HPLC preparou-se o eluente, que consiste numa solução de ácido sulfúrico (com 98% de pureza) a uma concentração de 5mM. Para lavagem da coluna entre amostras utilizou-se uma solução de ácido sulfúrico a 25mM. A solução (eluente) é desgaseificada antes de ser utilizada, usando-se um banho de ultrassons (em vácuo) durante 45 minutos, para o efeito. Sempre que o eluente é agitado ou se encontre armazenado há demasiado tempo, efetua-se uma nova desgaseificação.

2.4.4. HPLC

Após a preparação do eluente e tratamento das amostras a analisar, colocaram-se os *vials* no sistema de HPLC, com um controlador (CROCO - CIL, Temperature Control), um sistema de bomba de injeção (Waters, 515 HPLC Pump), associado a uma coluna de exclusão iónica para análise de açúcares e ácidos orgânicos (SUGAR SH1011, Shodex), um sistema de amostragem automática (Waters, 717 plus Autosampler), um sistema de deteção de absorvância na gama dos UV (Abs a 210nm) (WatersTM 486 Tunable Absorbance Detector) e um detetor de índice de refração (Waters 2410 Refractive Index Detector). A análise das amostras do HPLC foi controlada remotamente através de um computador, sendo que para cada uma das amostras a analisar se efetuaram 2 injeções, com uma duração de 30 minutos para cada. A continuação do processo deu-se na coluna a 60°C, com um fluxo de 0,5mL/min de ácido sulfúrico 5mM, sendo introduzidos no sistema 10 µL de amostra em cada injeção.



FIGURA 8: SISTEMA DE HPLC (ELUENTE À ESQUERDA NA IMAGEM – RECIPIENTE DE VIDRO COM TAMPA CINZENTA)

Retiraram-se os dados através do *software* “Empower pro”, dados estes que foram tratados numa folha de cálculo, obtendo-se as curvas de calibração e a concentração de cada composto nas amostras.

2.5. Provas sensoriais

As formulações com melhores características organoléticas segundo as provas ao longo do estudo, por parte das pessoas intervenientes, passando estas à análise do consumidor. As formulações finais foram então testadas por um grupo de voluntários (20 provadores), não treinados (consumidores). Foram servidas seis amostras a cada um, das formulações urze e eucalipto diluição 1:6. De ambas as diluições foram apresentados três tempos de fermentação diferentes sendo estes 3,4 e 5 dias.

As provas sensoriais realizaram-se numa sala de prova, previamente reservada. Serviram-se as amostras em copos de plástico transparentes e descartáveis, devidamente identificados com o código respectivo. Foi também disponibilizado um copo extra aos provadores para colocar água.

3. Resultados e discussão

3.1. Densidade

Neste trabalho foram utilizados méis variados, provenientes de diferentes tipos de flora. Entre esta gama foram testados o mel de laranjeira, rosmaninho, eucalipto, urze e um tipo de mel multifloral – mel de Lafões. Começou-se por determinar a densidade do mel, podendo-se observar os resultados na tabela abaixo.

TABELA 7: GRAMAS DE MEL POR 10 mL DO MESMO

Tipo	Gramas por 10 mL de mel	Diluições efetuadas
Laranjeira	11,5	-
Rosmaninho	11,3	1:3/1:4/1:6/1:8
Eucalipto	11,2	1:6/1:8
Urze	11,4	1:3/1:4/1:6/1:8
Multifloral de Lafões	11,5	1:6/1:8

3.2. Avaliação dos principais constituintes dos méis utilizados ao longo do estudo

Para a produção do espumante de mel considerou-se importante a avaliação/comparação dos principais constituintes do mesmo, isto porque diferentes concentrações dos diferentes constituintes influenciam grandemente o produto final. Este ensaio teve como principal objetivo comparar as concentrações de glucose e frutose nas diluições 1:6 e 1:8 dos méis a analisar (rosmaninho, urze, eucalipto e multifloral de Lafões). A glucose e a frutose representam cerca de 65-75% da composição do mel.

As diluições 1:6 e 1:8, para os quatro tipos de mel, foram preparadas como descrito em 2.3. De seguida retiraram-se 2 mL de cada amostra e analisou-se no sistema HPLC, cumprindo o procedimento anteriormente referido.

TABELA 8: PERCENTAGENS DOS CONSTITUINTES DAS DILUIÇÕES 1:6 E 1:8 PARA TODOS OS MÉIS UTILIZADOS AO LONGO DO ESTUDO

Diluições	Glucose (% p/vol)	Frutose (% p/vol)
Urze 1:6	8,8	10,4
Urze 1:8	6,5	7,9
Rosmaninho 1:6	8,9	10,1
Rosmaninho 1:8	7,4	8,4
Eucalipto 1:6	5,9	8,8
Eucalipto 1:8	4,5	6,9
Multifloral de Lafões 1:6	5,8	8
Multifloral de Lafões 1:8	4,5	6,8

TABELA 9: PERCENTAGENS TOTAIS MÉDIAS DE CADA AÇÚCAR PARA TODOS OS MÉIS UTILIZADOS AO LONGO DO ESTUDO

Tipo de mel	Glucose (% p/vol)	Frutose (% p/vol)
Urze	52,4	62,8
Rosmaninho	56,3	63,8
Eucalipto	35,7	54,0
Multifloral de Lafões	35,4	51,2

A tabela 8 apresenta os dados relativos às concentrações dos compostos analisados antes de ocorrer qualquer fermentação (tempo 0) para o mel de urze, rosmaninho, eucalipto e multifloral de Lafões. Com estes resultados, é possível concluir que as percentagens de açúcares quer no mel de urze, quer no de rosmaninho são relativamente superiores ao mel de eucalipto e multifloral de Lafões, tal como se pode observar pelos dados médios obtidos para cada um dos tipos de mel (Tabela 9). De notar que no caso do mel de eucalipto e do mel multifloral a percentagem de frutose é muito superior à da glucose.

Através da soma dos valores percentuais de glucose e de frutose, foi possível deduzir que a diluição 1:6 do mel de urze contém cerca de 19,2% de açúcares, e que, por outro lado, a diluição 1:8 contém 14,4%.

No mel de rosmaninho, diluição 1:6, o valor de açúcares em percentagem foi de 19%, valor, este, muito idêntico ao obtido na mesma diluição do mel de urze. Na diluição 1:8 a percentagem de açúcares foi de 15,8%, valor este relativamente superior à mesma diluição do mel de urze (cerca de 1,4%).

De igual modo obteve-se o valor dos açúcares presentes nos méis de eucalipto e multifloral de Lafões. Este valor foi de 14,7% para a diluição 1:6 do mel de eucalipto e de 13,8% para o mel multifloral de Lafões.

Comparativamente, na diluição 1:8, para o mel de eucalipto obteve-se o valor 11,4%, valor este muito próximo da percentagem de açúcares na mesma diluição do mel multifloral de Lafões, 11,3%.

Para o mel de urze e rosmaninho obteve-se um valor médio de percentagem de açúcares de 19,1% para a diluição 1:6, sendo que para a diluição 1:8 este valor médio foi de 15,1%. Já no caso do mel de eucalipto e multifloral de Lafões a média dos seus valores relativos à diluição 1:6 foi de 14,25% e para a diluição 1:8 foi de 11,35%.

Comparando os valores das percentagens totais médias (Tabela 9) com os valores tabelados preexistentes (Tabela 1) é possível constatar que os valores calculados através do HPLC, para os quatro tipos de mel, se encontram todos acima da média, quer para a glucose (31,28 %) quer para a frutose (38,19%).

3.3. Avaliação do consumo de substratos e produção de produtos ao longo da fermentação por HPLC (0, 3 e 15 dias)

3.3.1. Análise da evolução da concentração de açúcares (glucose e frutose) ao longo da fermentação

Com vista a avaliar a evolução da fermentação, foi considerado relevante analisar também a concentração dos constituintes das formulações, quer dos substratos metabolizados ao longo da fermentação quer dos produtos produzidos. Para tal recolheram-se amostras de cada diluição (1:6 e 1:8), tipo de mel (urze ou rosmaninho) ao tempo 0 (início da fermentação) e ao fim de 3 e 15 dias (relativos à primeira tentativa efetuada), para posterior tratamento e análise no HPLC. Dada a estranha aparência dos fermentados na 1ª tentativa (15 dias de fermentação) procedeu-se à observação ao microscópio das diluições 1:3, 1:4, 1:6 e 1:8 relativas ao rosmaninho e urze com as objetivas de 40x e 60x.

Começou-se por preparar placas de petri, contendo como meio de cultura agar, a 1:10 (100 µL para 900 µL) e 1:100 de todas as amostras de urze (1:6 e 1:8) relativas a 2, 3 e 4 dias de fermentação. De igual forma, preparam-se placas de 1:10 e 1:100 dos fermentados de rosmaninho e urze (diluições 1:3, 1:4, 1:6 e 1:8 – 15 dias de fermentação). No total foram analisadas 28 placas, 14 para a diluição 1:10 e outras 14 para a diluição 1:100.

Nas diluições fermentadas ao longo de 15 dias foi possível observar levedura nas formulações de rosmaninho, diluições 1:60, 1:600, 1:80 e 1:800 e no de urze diluição 1:60. Nesta diluição 1:60 foram também observados fungos. Na urze diluição 1:800 foi detectado a presença de uma bactéria.

Já relativamente às diluições de 2, 3 e 4 dias foi presenciado levedura que não *Saccharomyces* na diluição urze 1:60 (2 dias de fermentação) sendo que na placa da mesma diluição mas cuja duração da fermentação foi de 3 dias, detectou-se uma contaminação por bactérias. Por fim na urze 1:600 (3 dias de fermentação) ocorreu também uma contaminação por bactérias.

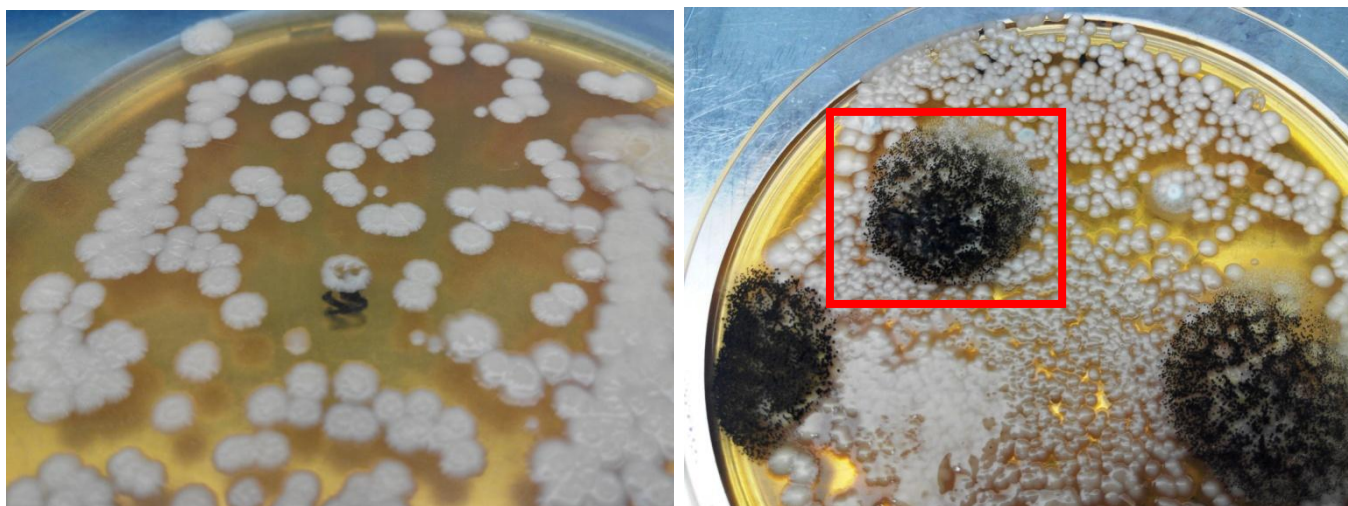


FIGURA 9: EXEMPLO DE SACCHAROMYCES DETECTADA (FIGURA À ESQUERDA) E COLÓNIAS DE FUNGOS (A VERMELHO- FIGURA À DIREITA)

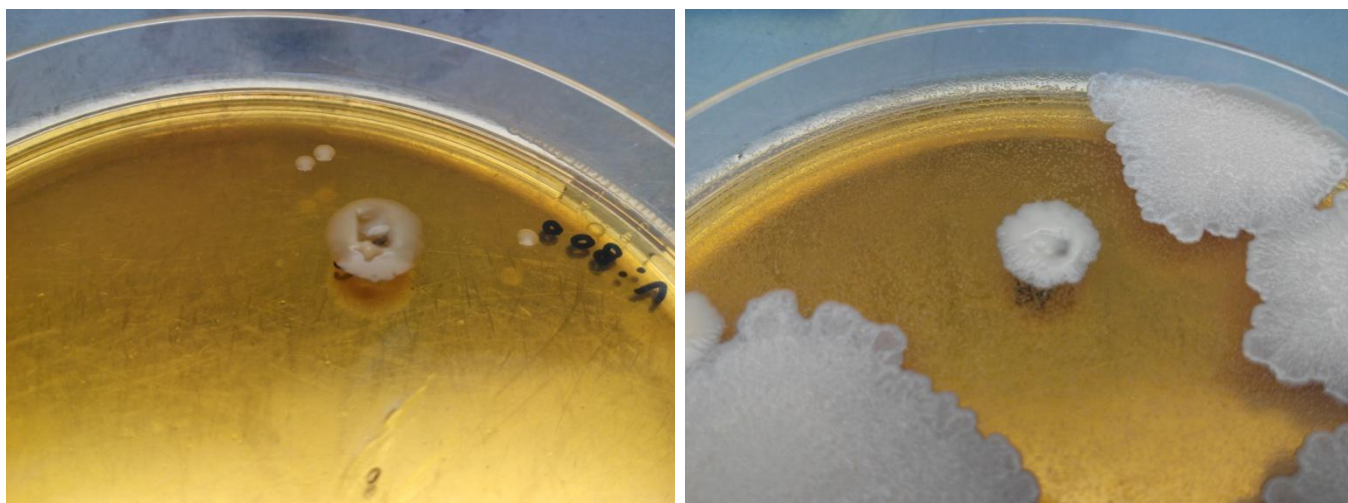


FIGURA 10: EXEMPLO DE OUTRA LEVEDURA QUE NÃO A SACCHAROMYCES (FIGURA À ESQUERDA) E CONTAMINAÇÃO POR BACTÉRIAS (FIGURA À DIREITA)

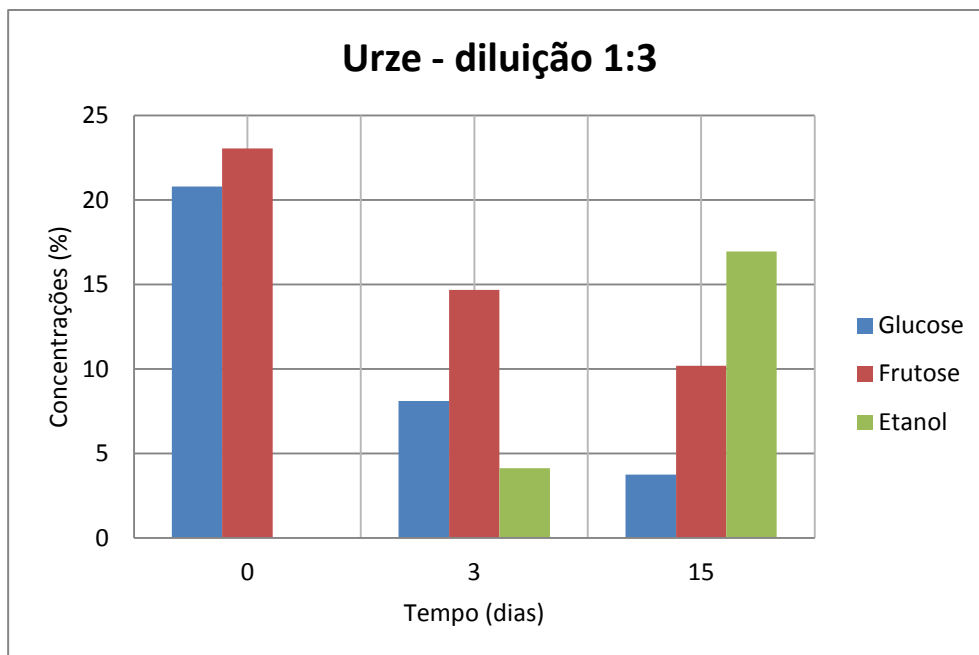


FIGURA 11: VARIAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES E ETANOL NA DILUIÇÃO 1:3 DE MEL DE URZE

Neste primeiro gráfico observa-se uma queda na concentração quer da glucose quer da frutose, esta queda é mais notória ao fim de três dias de fermentação, sendo que se mantém gradual até perfazer os 15 dias. Este já era o resultado esperado tendo em conta que ao iniciar a fermentação dá-se a metabolização dos açúcares simples e a consequente redução da concentração dos mesmos. No entanto, ao fim de 15 dias ainda existem açúcares residuais, não tendo a fermentação atingido o ponto de esgotamento total dos açúcares nestas condições.

Por outro lado, a concentração de etanol aumenta ao longo de todo o tempo de fermentação, como resultado da fermentação alcoólica a partir dos açúcares consumidos, atingindo valores de 16% (p/v). Este resultado indica ainda que os açúcares consumidos foram convertidos na sua totalidade a etanol.

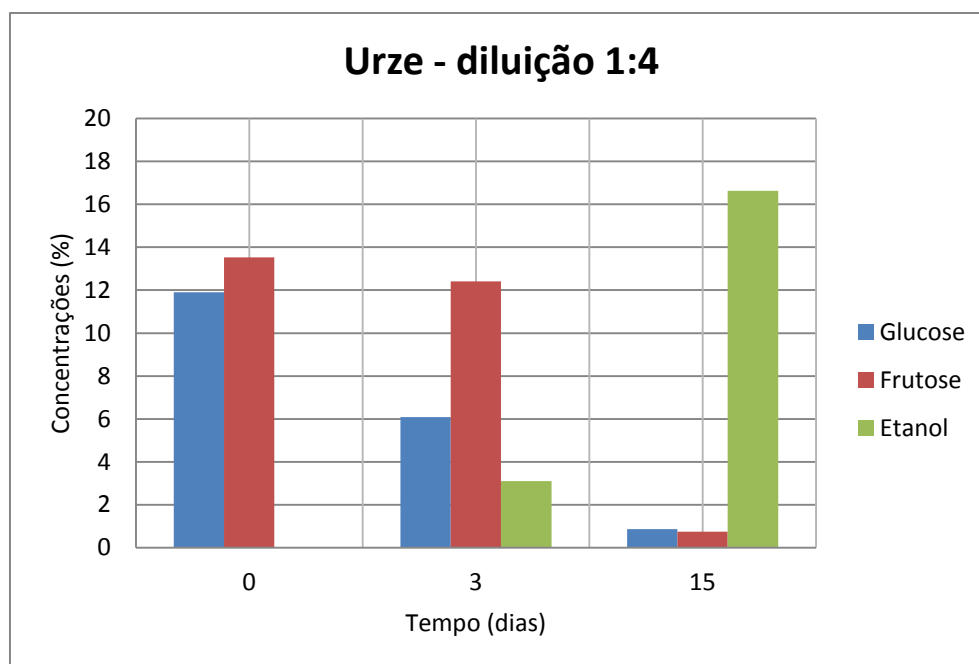


FIGURA 12: VARIAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES E ETANOL NA DILUIÇÃO 1:4 DE MEL DE URZE

Na formulação urze – diluição 1:4, as concentrações de glucose e frutose, no dia 0, encontram-se logicamente a valores abaixo das da diluição 1:3 do mesmo tipo de mel.

Também aqui, é notório o consumo dos açúcares simples ao longo do tempo e a sua conversão em etanol que, por outro lado, vai aumentando a sua concentração até valores muito próximos dos obtidos ao fim de 15 dias para a diluição 1:3 de mel de urze (aproximadamente 16%). Tal facto deve-se, muito provavelmente, ao consumo praticamente total dos açúcares simples ao fim dos 15 dias de fermentação, o que não se sucedeu na diluição anterior.

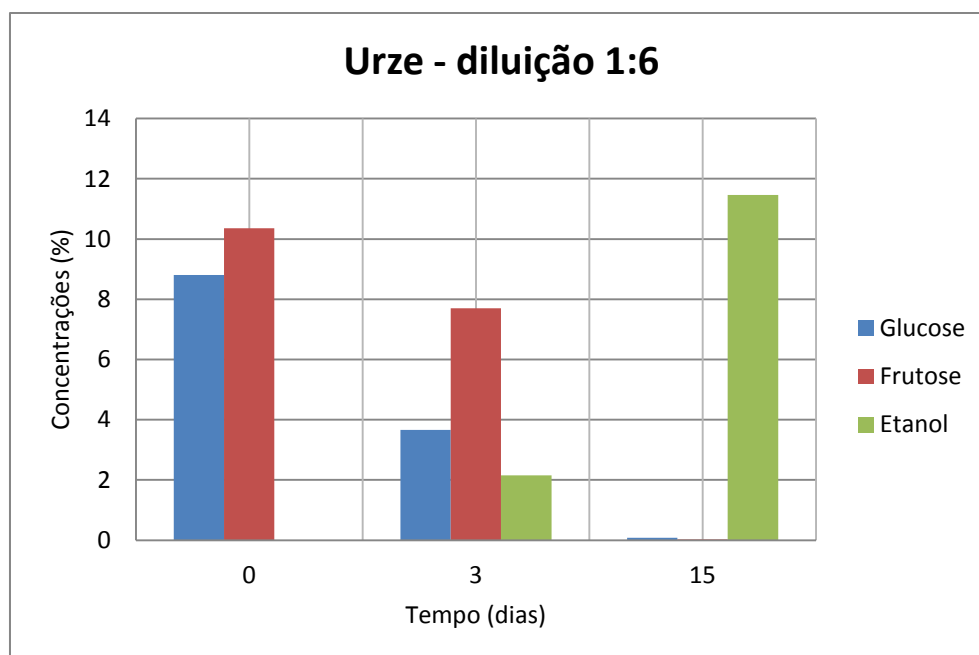


FIGURA 13: VARIAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES E ETANOL NA DILUIÇÃO 1:6 DE MEL DE URZE

A representação gráfica dos constituintes da diluição 1:6 do mel de urze, ao longo dos 3 períodos é muito semelhante à apresentada anteriormente na diluição 1:4 do mesmo mel.

Como é de esperar, os três componentes em análise têm valores inferiores de concentração comparativamente ao gráfico anterior, por outro lado, também aqui a glucose e frutose praticamente desaparecem da nossa formulação ao fim dos 15 dias. No mesmo sentido a concentração de etanol fica também aquém da observada acima, fixando-se neste caso nos 12% aproximados.

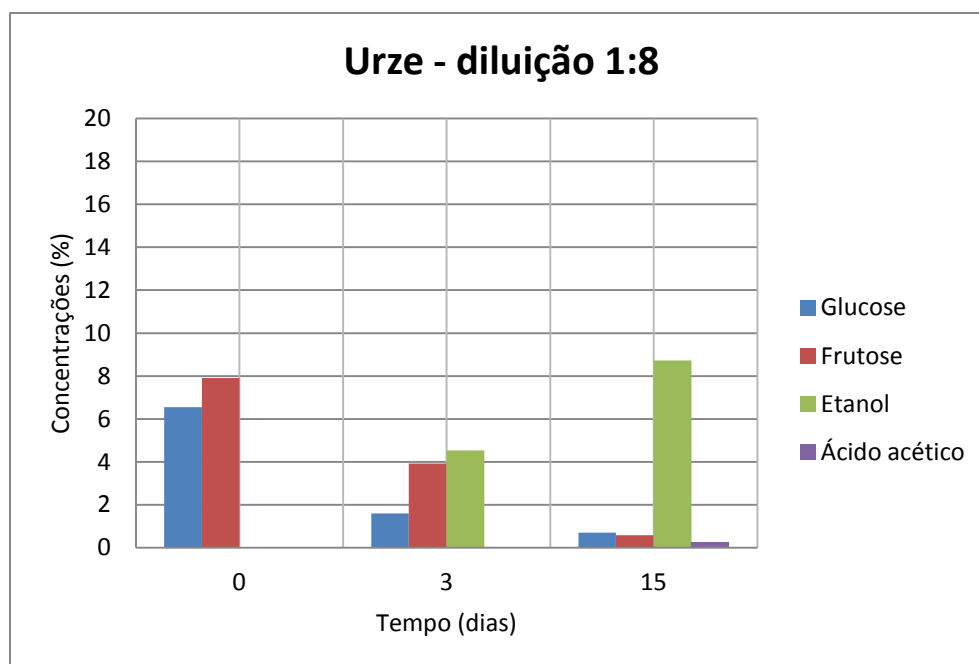


FIGURA 14: VARIAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES, ETANOL E ÁCIDO ACÉTICO NA DILUIÇÃO 1:8 DE MEL DE URZE

A última diluição do mel de urze fermentada apresenta um perfil muito idêntico ao das diluições 1:4 e 1:6 relativamente à redução das concentrações de glucose e frutose ao longo do tempo.

Nesta formulação existe um aumento mais gradual da concentração de etanol, sendo que de todas as diluições de mel de urze, ao fim de 3 dias, esta é a que contém maior percentagem de etanol, 4,5% aproximadamente. Por outro lado é a que contém o menor valor ao fim dos 15 dias de fermentação dado ser a diluição que contém menos açúcares simples. Tais valores de etanol não seriam de questionar caso não fosse detectada a presença de ácido acético (0,24%), provável culposos na quebra da concentração de etanol nos dias finais da fermentação.

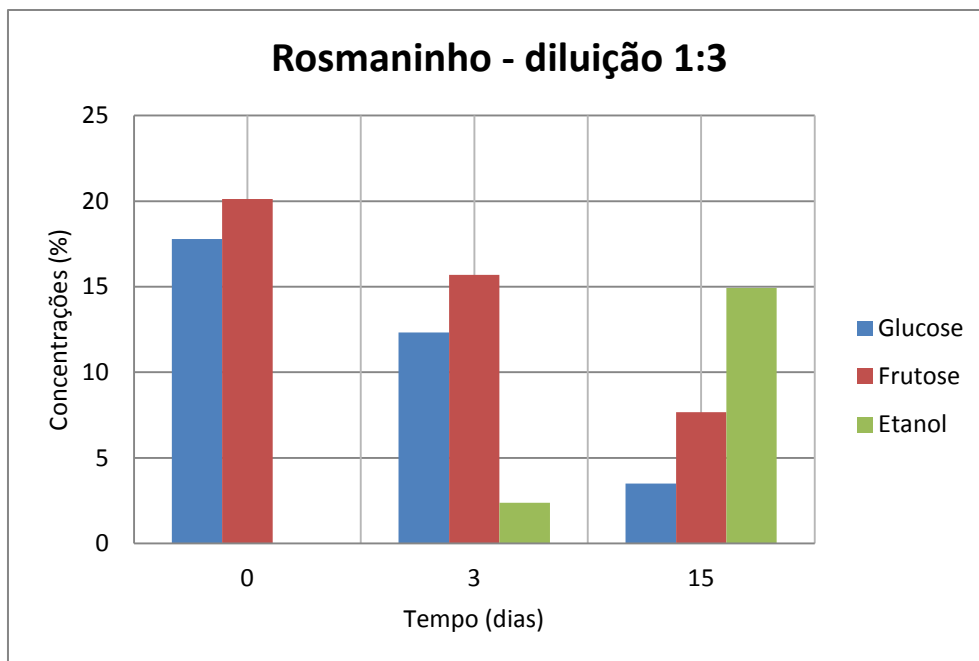


FIGURA 15: VARIAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES E ETANOL NA DILUIÇÃO 1:3 DE MEL DE ROSMANINHO

Na primeira formulação relativa ao mel de rosmaninho, os valores de glucose e frutose registaram uma descida significativa ao longo do tempo como seria de esperar, pode também observar-se que os açúcares não foram consumidos na totalidade ao fim dos 15 dias. Este decréscimo das concentrações de açúcares converge no aumento do valor de etanol ao longo do tempo, até ao final da fermentação (14,9%).

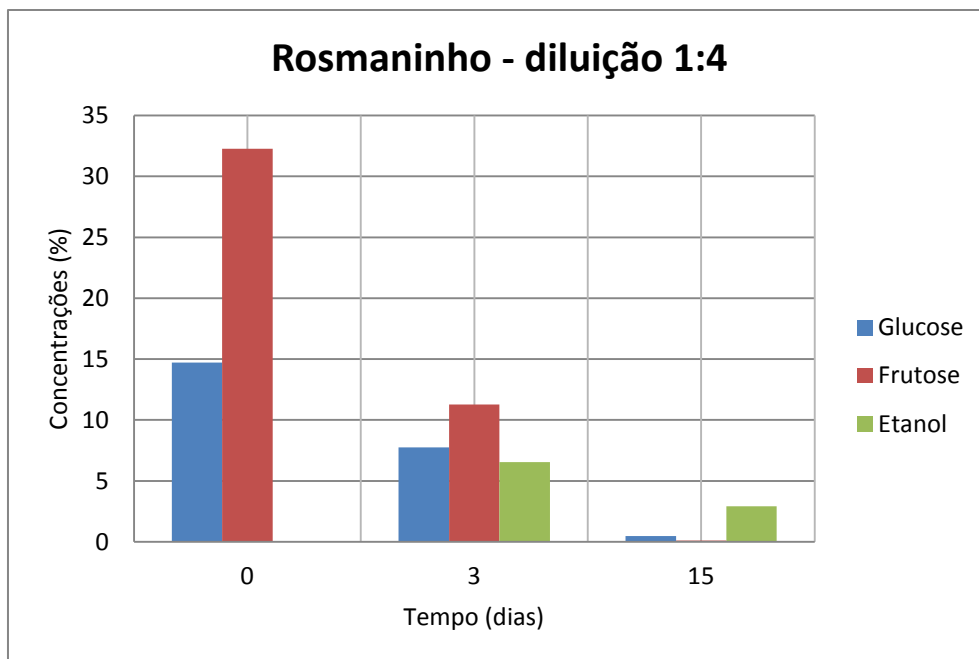


FIGURA 16: VARIAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES E ETANOL NA DILUIÇÃO 1:4 DE MEL DE ROSMANINHO

A presente formulação foi a que revelou resultados mais inesperados relativamente aos ensaios preliminares. Ao nível da concentração de glucose e frutose observa-se uma redução ao longo do tempo, reflexo do consumo dos mesmos, algo que seria de esperar e muito idêntico a todas as formulações avaliadas até agora.

O imprevisível encontra-se nos dados da concentração de etanol ao fim dos 15 dias. Esperava-se um aumento ao longo de todo o tempo de fermentação, algo que só se verifica no terceiro dia de fermentação. Este resultado discrepante poderá ter resultado de uma evaporação parcial do etanol durante a fermentação ou durante o tratamento da amostra.

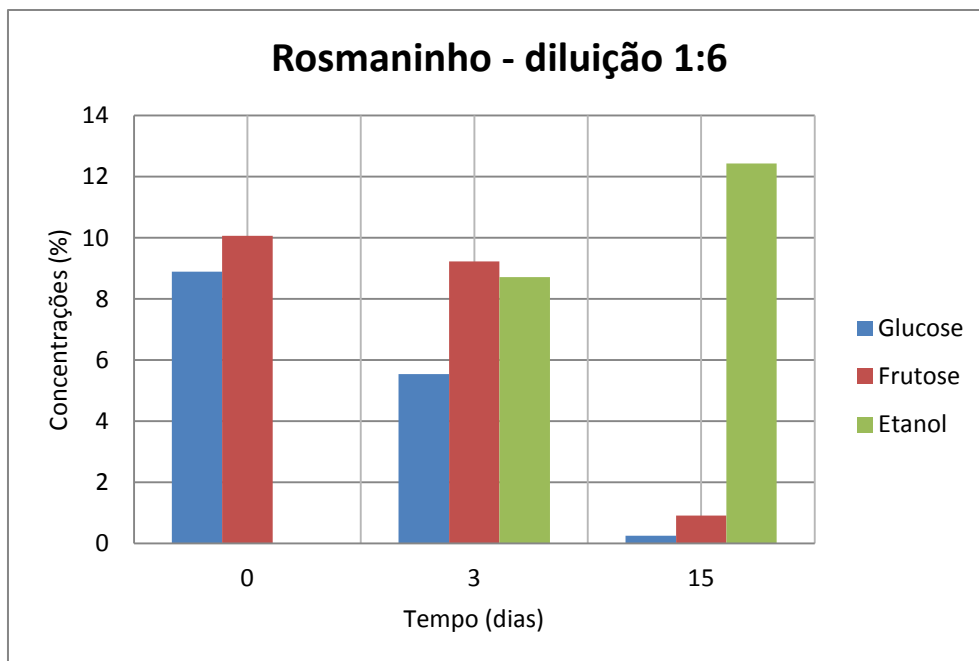


FIGURA 17: VARIAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES E ETANOL NA DILUIÇÃO 1:6 DE MEL DE ROSMANINHO

Na diluição 1:6 do mel de rosmaninho, as concentrações de glucose e frutose foram reduzindo gradualmente ao longo do tempo, reflexo da glicólise. Os valores de glucose e frutose registados foram muito próximos de 0, ao fim dos 15 dias de fermentação.

O etanol apresentou concentrações elevadas logo ao fim dos três dias de fermentação, tendo-se obtido aqui o maior valor ao fim deste período para todas as formulações do mel de rosmaninho (8,7%). Gradualmente, a concentração do etanol aumentou, atingindo uma concentração final de 12,4%.

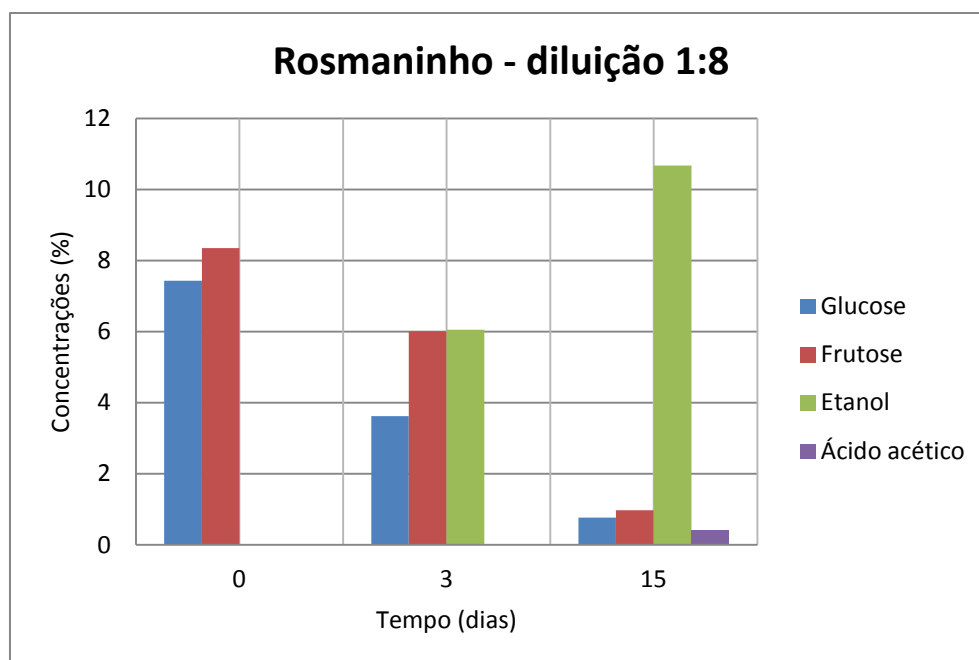


FIGURA 18: VARIAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES, ETANOL E ÁCIDO ACÉTICO NA DILUIÇÃO 1:8 DE MEL DE ROSMANINHO

A última formulação de rosmaninho registou um decréscimo da concentração de glucose e frutose ao longo do tempo, à semelhança do que já havia sido observado nos ensaios acima analisados. Ambas as concentrações diminuem para valores próximos de 0 até ao último dia de fermentação. Acompanhando a redução destas concentrações, a do etanol aumentou, conservando este comportamento até ao final do tempo de fermentação.

Apesar de não ter ocorrido um decréscimo da concentração de etanol, pode-se observar aqui um caso semelhante ao da diluição 1:8 do mel de urze, isto porque foi detectada a presença de ácido acético ao fim dos 15 dias de fermentação (0,4%).

Em termos globais verifica-se que em todos os casos o consumo de glucose foi mais pronunciado que o de frutose o que está de acordo com o carácter glucofílico da *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, para concentrações mais elevadas de açúcares (diluição 1:3), os açúcares não foram completamente consumidos o que se poderá atribuir a um metabolismo mais lento em condições de maior stress osmótico observadas quer no mel de urze quer no de rosmaninho que poderá inibir o crescimento e a fermentação, sendo necessário confirmar se os valores obtidos para a glucose e frutose nos vários tipos de méis, resultaram da paragem da capacidade fermentativa (stuck fermentation) ou de um metabolismo mais lento (sluggish fermentation) em resultado do stress osmótico ou de um desequilíbrio nos componentes do mel necessários ao crescimento.

3.4. Análise sensorial

3.4.1. Provas sensoriais das formulações

Como foi referido no ponto 2.6., ao longo de todo estudo foram realizadas provas dos fermentados que estavam a ser desenvolvidos. Para tal, no fim do tempo de cada fermentação, conservou-se no frigorífico (a 4°C) para posteriormente serem analisados sensorialmente pelo Mestrando, pela professora Catarina Prista e pela professora Maria Loureiro Dias.

Estas provas foram efetuadas no laboratório de Bioenergética Microbiana sendo que os três provadores foram trocando impressões entre si aquando da prova de uma nova amostra. Abaixo é possível descortinar as conclusões/avaliações ao longo destas mesmas provas.

3.4.2. Ensaio preliminares

Numa primeira abordagem foram efectuadas fermentações de mel de rosmaninho e urze. Para cada um deles foram testadas várias diluições de mel em água (1:3, 1:4, 1:6 e 1:8).

Os resultados obtidos para as soluções diluídas e para cada um dos méis, permitiram observar que:

- Mel de rosmaninho

Não se detectou gás ao abrir os frascos (possível fuga devido ao recipiente não ser o mais adequado). Começou-se pela concentração mais baixa (1:8), na qual foi detetado um aroma estranho e através da observação foi possível concluir que ocorreu uma fermentação extra (turvação adicional).

O rosmaninho aparentou ser um mel pouco complexo, pouco marcante a nível sensorial. As provas das diluições 1:3 e 1:4 foram abortadas relativamente a uma próxima fermentação já que os resultados das mesmas serem demasiado doces e enjoativos. A nível da cor e comparando com o mel de urze as amostras são muito mais claras.

- Mel de urze

Ao abrir os frascos foi possível detetar a presença de gás nas diluições 1:4 e 1:6, estando este mais presente na segunda diluição. Através da observação conclui-se que, tal como no mel, também o de urze é mais escuro que o de rosmaninho, bem como mais turvo.

A nível da degustação este teve mais sucesso pois é um mel mais complexo que o acima analisado, sendo sensorialmente mais agradável, sentindo-se inclusive mais o sabor a mel. A diluição a 1:8 apresenta aparentemente mais álcool que qualquer outra amostra em estudo. Tal como no rosmaninho também as diluições 1:3 e 1:4 foram abortadas.

No fim desta prova foi possível concluir que apenas se voltaria a produzir as concentrações 1:6 e 1:8 de méis mais intensos tal como o de urze, eucalipto e multifloral de Lafões.

3.4.3. Ensaio de fermentação

Uma vez que o rosmaninho aparentou ser um mel pouco complexo e pouco marcante a nível sensorial optou-se nesta segunda etapa por testar outros méis (eucalipto e multifloral de Lafões), prosseguindo os testes com o de urze. Foram também abortadas as diluições 1:3 e 1:4 visto os resultados das mesmas serem demasiado doces e enjoativos.

- Mel multifloral de Lafões

Na diluição a 1:6 não se detetou a presença de gás, tendo um sabor mais doce e gosto a levedura. Foi também possível observar que esta diluição se encontrava turva. Quanto à diluição 1:8 já foi possível detetar a presença de gás bem como a presença de mel no espumante - gosto interessante.

- Mel de eucalipto

Foi logo detetado um gosto definido a eucalipto, bem como cheiro, na diluição 1:6. Esta é a diluição com mais gás desta segunda tentativa. Relativamente à diluição 1:8 esta é mais adstringente, tendo também gás em grande quantidade. Contudo é uma diluição que sabe pouco a mel e ligeiramente a remédio.

- Mel de urze

Nas diluições 1:6 e 1:8, de dois dias, foi possível detetar um odor a manteiga velha bem como a falta de gás (tendo sido prontamente reprovado). Quanto às diluições de três dias foi detetado cheiro a remédio e sabor desagradável na diluição 1:6 e falta de açúcar, sabor amargo e presença de gás na diluição 1:8. Quanto às diluições de quatro dias, ambas cheiravam a bafio e não foi detetado gás.

Visto que as diluições do mel de urze deram origem a um espumante com sabor a manteiga e odor estranho, decidiu refazer-se as respectivas diluições e fermentá-las (agora durante apenas 3 dias). Tal decisão adveio do facto de que os méis que fermentaram ao fim de dois dias terem apresentado um gosto muito doce e uma baixa concentração de gás, o que reflete uma fermentação deficiente a nível de duração.

3.4.4. Ensaios finais (prova com a presença do produtor de mel)

Neste ensaio foi adicionado ao nosso lote de substratos o mel caramelizado com mel caramelizado de urze. Foi também reproduzida parte dos ensaios de fermentação sendo que se refizeram as diluições 1:6 e 1:8 para os três tipos de mel, mas fermentando apenas durante 3 dias. Esta repetição deveu-se à deficiência sensorial notada nas diluições dos três tipos de mel (urze, eucalipto e multifloral de Lafões).

- Mel caramelizado de urze

Em relação às apreciações dos fermentados a partir de mel caramelizado de Urze, as conclusões foram: as diluições 1:6 fermentaram pouco e não se sentia o sabor a caramelo. Relativamente à diluição 1:8, esta apresentava pouco gosto. Com isto foi decidido abortar a fabricação deste espumante a partir de mel caramelizado.

- Mel de urze

Quanto aos espumantes a partir do mel de Urze, foi possível observar que a diluição 1:6 continha mais gás que a 1:8, sendo que a segunda se encontrava mais turva e as bolhas presentes eram de um tamanho relativamente menor. Para além deste termo comparativo a diluição 1:8 apresentou um sabor ácido desagradável, enquanto a 1:6 apresentou um *outflavour* não identificado por nenhum dos provadores presentes.

- Mel multifloral de Lafões

No espumante a partir de mel multifloral de Lafões a diluição 1:6 foi a que mais gás teve nesta terceira tentativa. Sentiu-se o pico a gás, *flavour* agradável, mais doce, mas menos intenso. A diluição 1:8 é mais clara que o anterior, tendo uma aparência deslavada e um sabor pouco marcante.

- Mel de eucalipto

O espumante a partir de mel de Eucalipto é o que contém menos gás dos quatro espumantes fabricados, quer na diluição 1:6 quer na 1:8. Na primeira diluição (1:6) esperava-se a presença de muito gás, dada a observação de bolhas visíveis, no entanto, o mesmo não se verificou ao provar, o sabor é agradável. A segunda diluição tem muito pouco gás, apresentando-se com uma cor muito clara, não tendo interesse devido a um *outflavour* ácido.

3.5. Formulações finais

Ao longo das provas sensoriais internas foram-se reduzindo as possibilidades até chegar à conclusão que os melhores méis para apresentar ao consumidor seriam o de urze e eucalipto, na diluição 1:6, sendo ambos fermentados ao longo de 3, 4 e 5 dias.

As formulações de mel de rosmaninho, e subconsequentemente de laranjeira (o mais claro dos méis e portanto menos intenso), foram rejeitados ao fim da primeira tentativa pois apresentaram-se pouco complexos. Foi também nesta tentativa, que foram abortadas as diluições 1:3 e 1:4 pois eram demasiado doces e enjoativas. O mel de urze continuou em estudo tendo sido um dos finalistas devido ao seu sabor complexo e agradável.

Após ficarmos restringidos às diluições 1:6 e 1:8 e ter-se chegado à conclusão que méis mais complexos dariam origem a um melhor espumante optou-se por continuar a utilizar o mel de urze e adicionar ao leque de opções o mel de urze caramelizado, mel de eucalipto e mel multifloral de Lafões. O primeiro dos três foi rejeitado em ambas as diluições por ter pouco gosto. O segundo continuou em estudo por ser o que apresentava aparentemente mais gás e um gosto definido a eucalipto. Por fim, o terceiro acabou por ser também rejeitado visto que dava origem a um espumante geralmente turvo e de gosto pouco marcante. Foi então que também se afunilaram as

hipóteses a nível das diluições, apresentado a diluição 1:6 melhores resultados a nível de produto final, sendo que os fermentados provenientes da diluição 1:8 tinham também um gosto mais ácido.

Assim, as opções foram então reduzidas a uma diluição (1:6) e a dois tipos de mel, sendo estes o de urze e eucalipto. Ao nível do tempo de fermentação, as 72h (3 dias) foram as que obtiveram maior aceitação ao longo de todas as provas internas, tendo-se optado então por fazer também os tempos 92h (4 dias) e 120h (5 dias).

TABELA 10: FORMULAÇÕES FINAIS ESCOLHIDAS E RESPECTIVOS CÓDIGOS PARA PROVA AO CONSUMIDOR

Formulações finais	Código
Urze 1:6 – 3 dias de fermentação	E1
Urze 1:6 – 4 dias de fermentação	E2
Urze 1:6 – 5 dias de fermentação	E3
Eucalipto 1:6 – 3 dias de fermentação	E4
Eucalipto 1:6 – 4 dias de fermentação	E5
Eucalipto 1:6 – 5 dias de fermentação	E6

3.6. Provas sensoriais das formulações finais (consumidor)

Como já foi referido no ponto 2.6, estipulou-se um número de 20 provadores para a prova ao consumidor, tendo-se obtido o número estipulado. O inquérito de prova incluía inicialmente questões relacionadas com o provador tais como nome e data de nascimento.

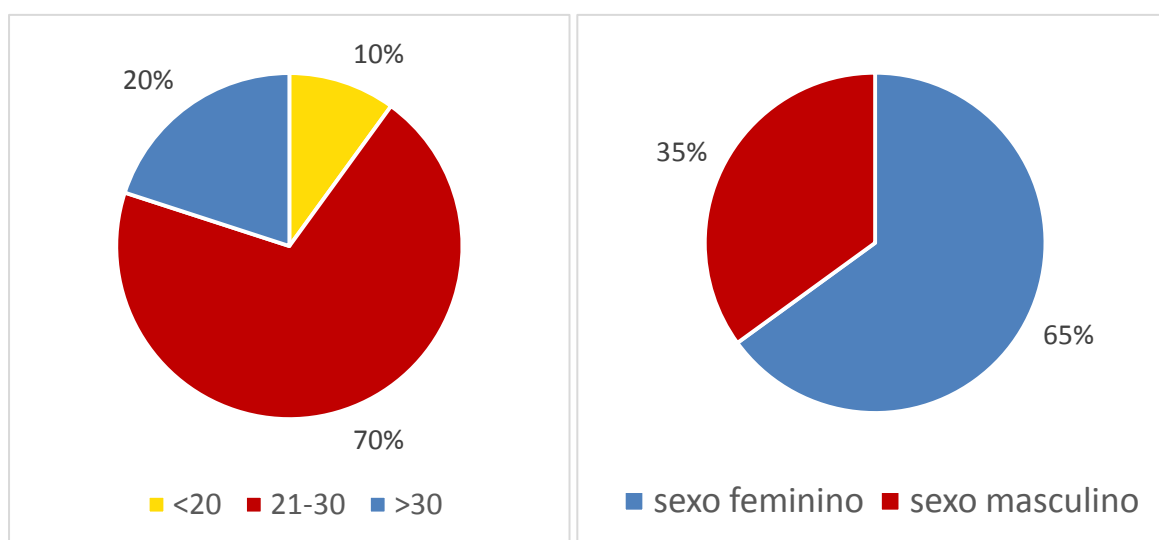


FIGURA 19: ESQUEMATIZAÇÃO DA IDADE DOS PROVADORES (À ESQUERDA) E SEXO DOS MESMOS (À DIREITA)

Como é possível analisar pela figura acima a maioria dos provadores estava inserido na faixa etária dos 21 aos 30 anos (70%), seguido do grupo mais de 30 anos de idade (20%), e por fim menos de 20 (10%).

Na mesma figura é possível verificar que a maioria dos provadores era do sexo feminino (65%), com apenas 35% do sexo masculino.

Nesta prova as características analisadas foram divididas em quatro grupos sendo estes a visão, olfato, paladar e mercado. Na visão foi analisada a intensidade de cor e limpidez, no olfato a complexidade aromática e intensidade aromática, no paladar a complexidade, o equilíbrio (entre acidez e doçura), a adstringência, corpo/estrutura (simples ou encorpado) e fim de boca. Para finalizar a prova, foi também analisado o mercado ao nível da aceitação do produto /intenção de compra.

Todas estas características foram avaliadas numa escala de 1 a 7 (Anexo III).

Na avaliação dos resultados relativos aos formulários preenchidos pelos provadores optou-se por se comparar, em primeira instância, as três amostras iniciais e seguidamente as três finais. Isto deve-se ao facto de a preferência entre o espumante

produzido a partir de mel de urze ou de eucalipto ser uma avaliação feita com base somente nos gostos pessoais.

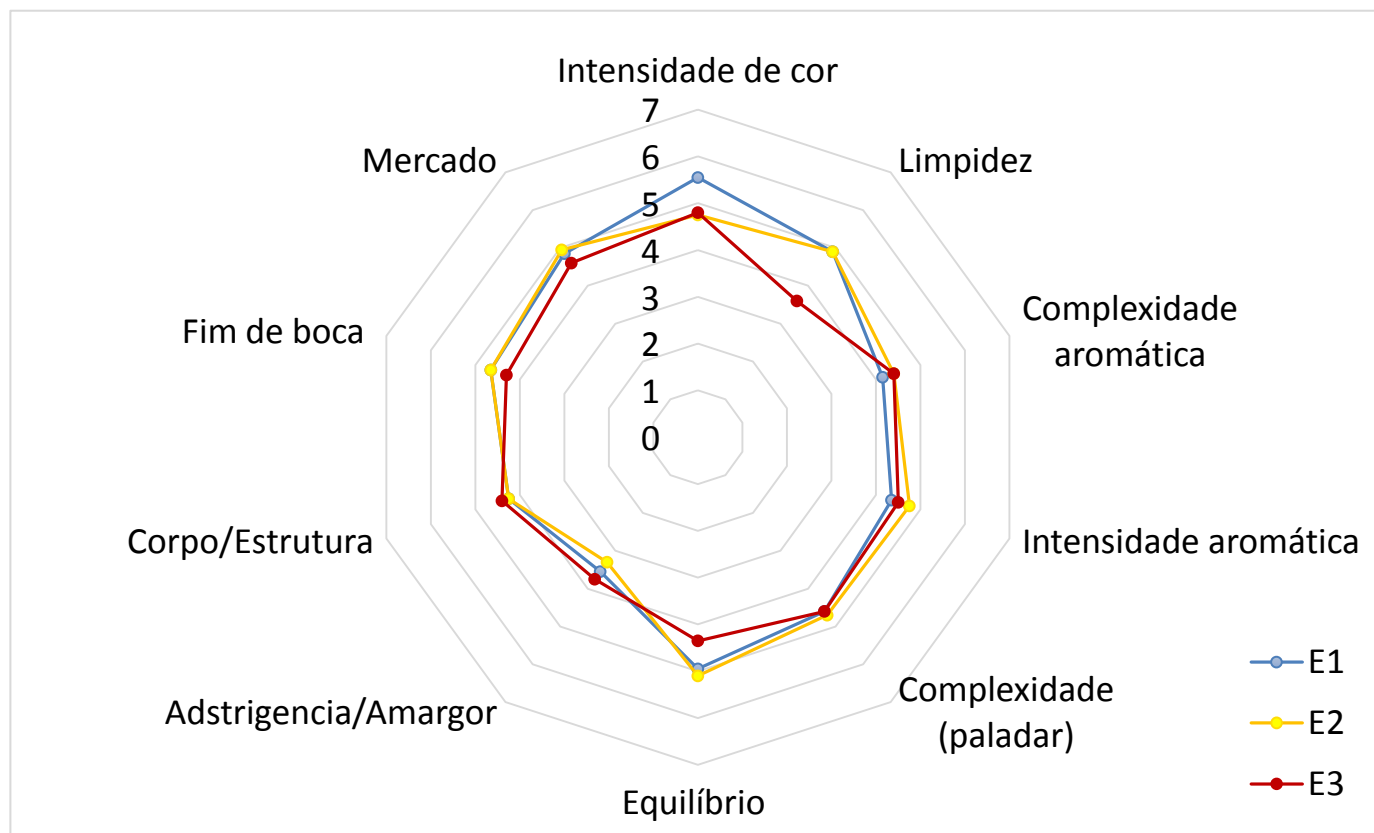


FIGURA 20: COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS E MERCADO PARA AS FORMULAÇÕES COM 3,4 E 5 DIAS DE FERMENTAÇÃO PARA A DILUIÇÃO 1:6 DE MEL DE URZE

Começando pela intensidade de cor, observou-se uma média de 5,55 para a amostra E1 (mel de urze na diluição 1:6 – 3 dias), 4,75 para E2 (mel de urze na diluição 1:6 – 4 dias) e 4,8 para E3 (mel de urze na diluição 1:6 – 4 dias). A limpidez teve a mesma avaliação para a amostra E1 e E2, ou seja, uma média de 4,9, sendo que para a amostra E3 este valor foi de 3,6, bastante abaixo dos anteriores.

Para a complexidade aromática obteve-se um valor de 4,15 para E1 e 4,4 para as amostras E2 e E3. Por outro lado, a intensidade aromática registou valores de 4,35, 4,7 e 4,6 para a amostra E1, E2 e E3, respectivamente.

Olhando agora para características do paladar, a nível da complexidade o E2 foi o que obteve uma média superior, 4,7, sendo que o E1 e E3 estiveram pouco abaixo, ambos com o valor de 4,6. (ao nível da complexidade do paladar os consumidores não manifestaram diferença praticamente nenhuma). O equilíbrio (entre acidez e doçura) teve o valor de 4,95 para a amostra E1, 5,1 para a amostra E2 e 4,35 para a amostra

E3. A adstringência revelou valores muito aproximados, para E1 obteve-se a média 3,55, para E2 3,3 e para E3 o valor 3,75. Ao nível do corpo/estrutura auferiu-se o valor 4,25 para a amostra E1 e E2 e 4,4 para E3. Também no fim de boca as amostras E1 e E2 coincidiram obtendo-se o valor médio de 4,65, já para a E3 o valor foi 4,3.

Por fim a nível de mercado o E2 foi a que obteve o melhor resultado. 4,95, já o segundo lugar pertence à amostra E1 com 4,85 e em terceiro a amostra E3, com o valor 4,6.

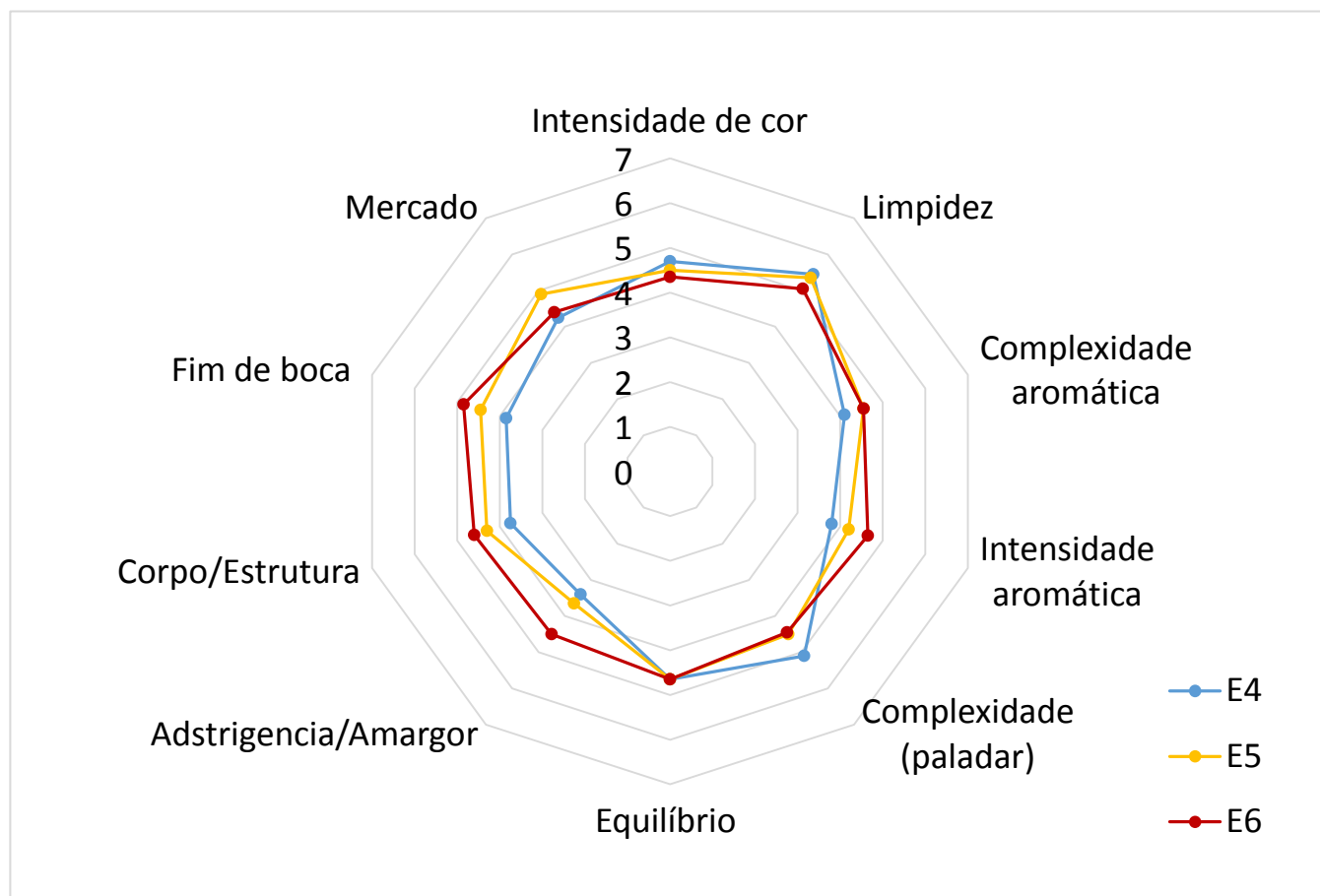


FIGURA 21: COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS E MERCADO PARA AS FORMULAÇÕES COM 3,4 E 5 DIAS DE FERMENTAÇÃO PARA A DILUIÇÃO 1:6 DE MEL DE EUCALIPTO

Passando agora à análise das últimas três amostras, referentes ao espumante fabricado através de mel de eucalipto, na intensidade de cor observou-se uma média de 4,7 para a amostra E4 (mel de eucalipto na diluição 1:6 – 3 dias), 4,5 para E5 (mel de eucalipto na diluição 1:6 – 4 dias) e 4,35 para E6 (mel de eucalipto na diluição 1:6 – 4 dias). A limpeza no caso da E4 deteve o valor de 5,45, a amostra E5 teve média de 5,35 e E6 o valor 5,05.

Na área olfativa e para a complexidade aromática obteve-se um valor de 4,1 para E4 e 4,55 para as amostras E5 e E6. Por outro lado, a intensidade aromática registou

valores de 3,8, 4,2 e 4,65 para as amostras E4, E5 e E6, respectivamente.

Examinando agora as características do paladar, a nível da complexidade o E4 foi o que obteve uma média superior, 5,1, o E5 e E6 estiveram abaixo, ambos com valores muito próximos, sendo 4,5 e 4,45, respectivamente. O equilíbrio (entre acidez e doçura) adquiriu o valor de 4,65 para as três amostras (E4, E5 e E6), na opinião dos consumidores. A adstringência teve valores muito aproximados para as amostras E4 (3,4) e E5 (3,65), sendo que para a amostra E6 esta média foi ligeiramente superior (4,5). Ao nível do corpo/estrutura conseguiu observar-se valores crescentes tendo E4 o valor 3,75, para a amostra E5 o valor 4,3 e 4,6 para a amostra E6. Também no fim de boca as amostras tiveram avaliações crescentes, E4 com o valor 3,85, o valor médio de 4,45 para E5 e por fim 4,85 para a E6.

Para finalizar a nível de mercado o E5 foi a que obteve o melhor resultado 4,9, sendo que o segundo lugar pertence à amostra E6 com 4,4 e em terceiro a amostra E4 com o valor 4,25.

Ao comparar as duas análises (E1, E2, E3 e E4, E5, E6) entre si, é possível observar coincidências a nível das avaliações por parte dos provadores. No caso da visão, foi possível concluir que ambas as categorias, intensidade de cor e limpidez, vão diminuindo com o aumento do tempo de fermentação. Por outro lado na avaliação olfativa, quer a complexidade aromática quer a intensidade aromática, apresentaram valores crescentes com o aumento do tempo de fermentação. Ao nível do paladar as distinções por parte dos provadores já foram menos evidentes, sendo que os valores das médias nunca tiveram uma diferença superior a 0,8. Apesar de não ter havido grande distinção por parte do consumidor ao nível do paladar, é curioso observar-se uma tendência para as fermentações de 4 dias em ambos os tipos de mel, obtendo as amostras E2 e E5 os maiores valores a nível de intenção de compra, 4,95 e 4,9 respectivamente. Embora o E5 tenha obtido um valor de intenção de compra muito idêntico ao E2, é possível especular que o espumante de mel de urze (diluição 1:6) tenha mais sucesso entre os consumidores visto a média do E1, E2 e E3 ser 4,68 e a de E4, E5 e E6 ser 4,52.

4. Considerações finais e perspectivas futuras

Com o presente trabalho foi possível o desenvolvimento de uma nova bebida fermentada espumante. Foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, imobilizada em alginato, para se proceder à fermentação alcoólica dos açúcares constituintes do mel, sendo estes convertidos em etanol. De acordo com o esperado, verificou-se que ao longo das fermentações efetuadas as concentrações de açúcares, quer glucose quer frutose, sofreram um gradual decréscimo das suas concentrações.

Pode-se considerar que os principais objetivos deste trabalho foram alcançados uma vez que: foram desenvolvidos processos para obtenção de uma nova bebida fermentada espumante a partir do alimento base (mel); foram produzidas e estudadas 34 formulações diferentes, tendo sido as formulações urze 1:6 e eucalipto 1:6 as escolhidas (fermentadas durante 3 tempos diferentes – 3, 4 e 5 dias) para serem apresentadas à avaliação sensorial por parte do consumidor; por fim foi possível também constatar uma boa aceitação das bebidas por parte do consumidor, uma vez que os valores de intenção de compra variaram de 4,25 e 4,95 (numa escala de 1 a 7).

No âmbito das perspectivas de futuro seria bastante proveitoso aprofundar a análise físico-química das bebidas para se obter conclusões mais detalhadas acerca dos seus constituintes. Também seria útil um estudo que visasse a produção industrial, isto porque foram observadas algumas dificuldades durante o processo de produção, nomeadamente a nível da filtração. Dentro ainda da área indústria, mas já numa fase mais avançada, seria essencial desenvolver um estudo de mercado alargado, a nível da concorrência, posição no mercado, custos associados, publicidade e estratégia de lançamento.

5. Referências bibliográficas

- [1] KRISHNAN, Viswanathan, e Karl T. Ulrich. "Product development decisions: A review of the literature". Management science 47 (2001)
- [2] POOLTON, Jenny, e IAN Barclay. "New product development from past research to future applications". Industrial Marketing Management 27, nº 3 (1998)
- [3] BAXTER, Mike. "Projeto de produto: guia prático para o design de novos produtos". 2º ed.
- [4] TROTT, Paul. Gestão da Inovação e Desenvolvimento de Novos Produtos. Artmed Editora - Grupo A Educação (2012)
- [5] COOPER, Robert. "Stage-gate systems: A new tool for managing new products" (1990)
- [6] Oslo Manual: The Measurement of Scientific and Technological Activities. Proposed Guidelines for Collecting and Interpreting Innovation Data; OCDE (2005)
- [7] http://www.sograpevinhos.com/enciclopedia/guia_vinho/vinificacao/espumantes, consultado a 18 de Abril de 2016
- [8] CARVALHEIRA José "Elaboração de Vinhos Espumantes – Método Clássico", DRAPC EVB
- [9] SOUZA Julio, PEIXOTO Aristeu, TOLEDO Francisco "Enciclopédia agrícola brasileira", EdUSP (1995)
- [10] Roger, Jorge D. Pamplona "A Saúde Pela Alimentação. Madrid Espanha" Editorial Safeliz (2001)
- [11] MUNOZ, O, Copaja, S, Speisky, H., PENA RC & Montenegro G. "Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante" (2007)
- [12] VENTURINI, K.S; Sarcinelli, M.F; Silva, L.C "Características do Mel In: Boletim Técnico"
- [13] ROBINSON J. "The Oxford Companion to Wine" Oxford University Press (2006)
- [14] JOHNSON H. "Vintage: The Story of Wine" (1989)
- [15] BELTRAN Gemma, TORIJA Maria Jesus, NOVO Maite, FERRER Noemi, POBLET Montserrat, GUILHAMON Jose M., ROZES Nicholas. "Analysis of Yeast Populations During Alcohol Fermentation: A Six Year Follow-up Study" (2002)
- [16] JACKSON, Ronald S. "Wine Science Principles and Applications" San Diego, California: Academic Press (2008).
- [17] BIRLD D. "Understanding Wine Technology" DBQA Publishing (2005)
- [18] MACNEIL K. "The Wine Bible" Workman Publishing (2001)
- [19] JUNTER, G. A.; JOUENNE, T. Immobilized viable microbial cells: from the

process to the proteome in leader or the cart before the horse. *Biotechnology Advances*, New York, v. 22, n. 8, p. 633-658, 2004.

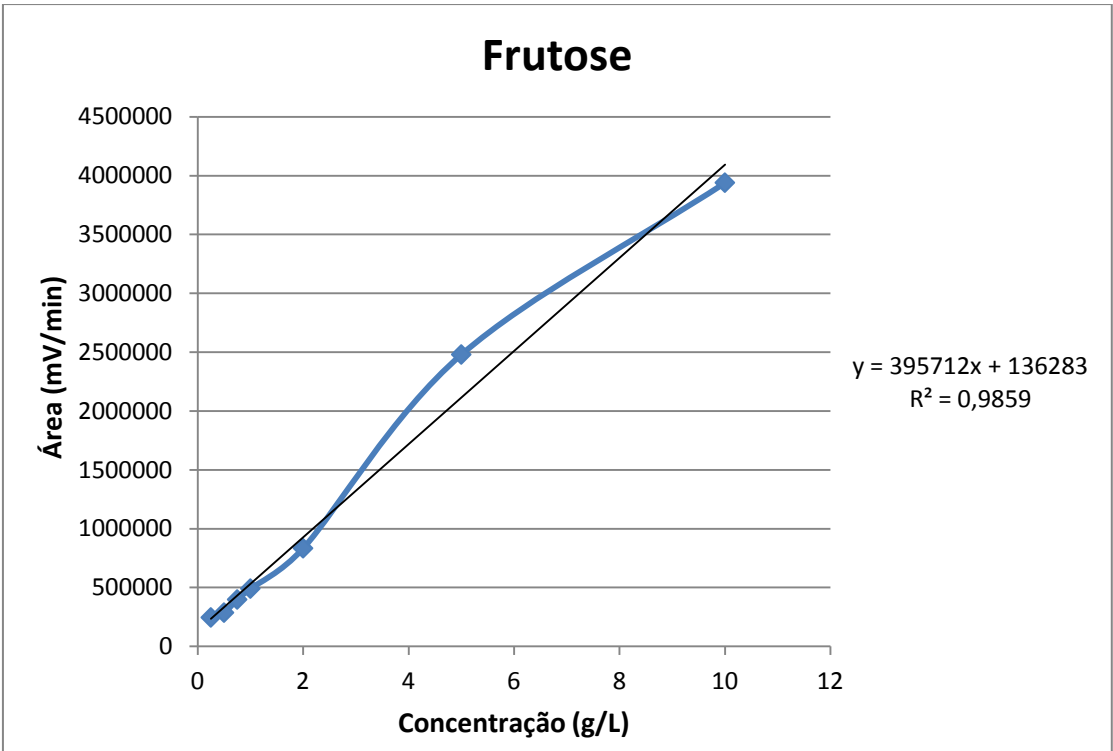
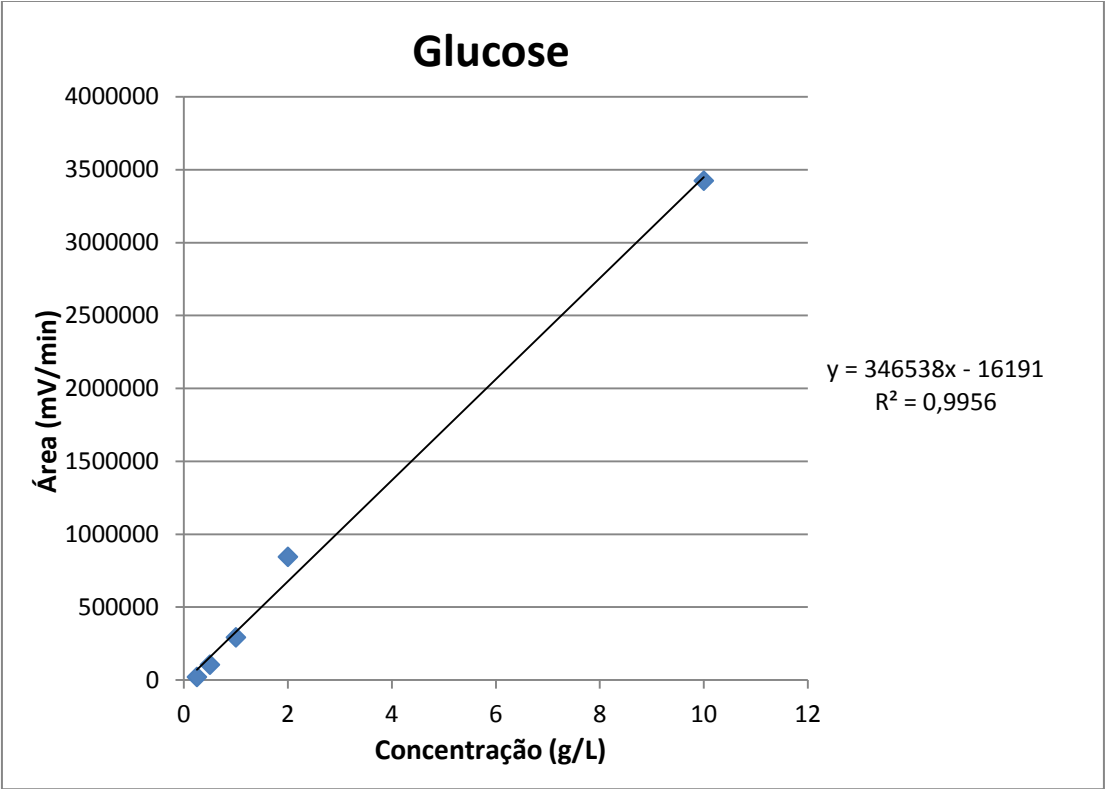
[20] FENG , K-C.; ROU , T-M.; LIU , B-L.; TZENG , Y-M.; CHANG , Y-N. Effect of fungal pellet size on the high yield production of destruxin B by *Metarhizium anisopliae*. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 34, n. 1, p. 22-25, 2003.

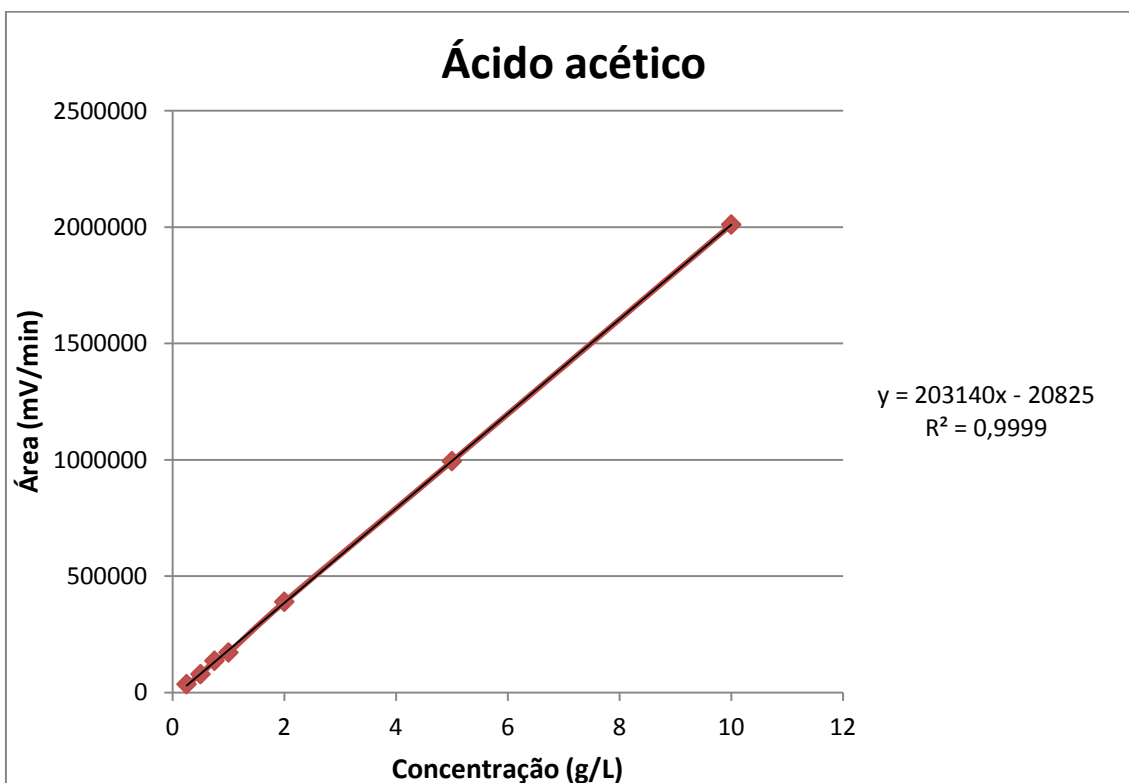
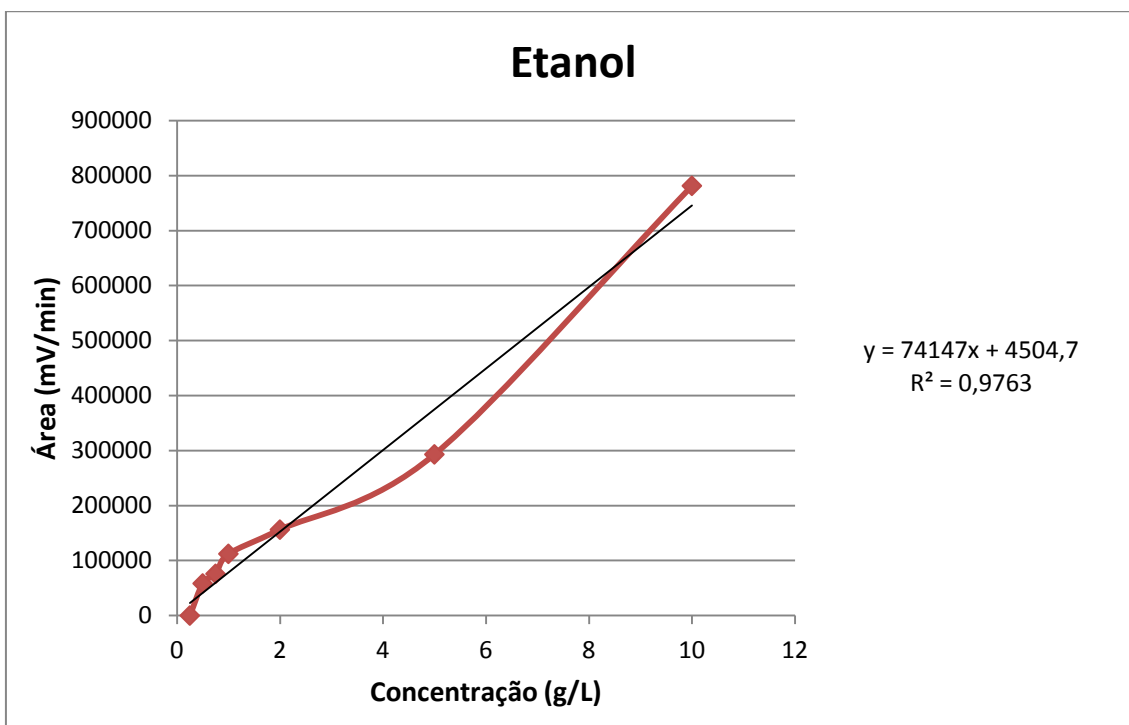
[21] WANG , L.; RIDGWAY IDGWAYIDGWAY, D.; GU, T.; MOO -YOUNG , M. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnology Advances*, New York, v. 23, n. 2, p. 115-129, 2005.

Anexos

Anexo I

Curvas de calibração





Anexo II

Tempos de retenção

Utilizando os dados obtidos a partir de cada amostra (HPLC), foram determinadas as concentrações de cada composto em cada uma das formulações ao longo do tempo. Para tal, o valor da área de cada composto foi inserido na respectiva equação, obtida através das curvas de calibração. Cada composto é identificado por um tempo de retenção específico.

Composto	Tempo de retenção a 5mM (minutos)
Glucose	11,32
Frutose	12,01
Ácido acético	16,90
Etanol	23,43

Anexo III

Folha de prova



Análise sensorial de espumantes de mel

Informações

Nome:
Data de nascimento:

Código da amostra:
Data da sessão:

Regras comportamentais

Todos os provadores envolvidos na análise devem respeitar as seguintes regras comportamentais e de higiene:

- Não usar qualquer tipo de cosméticos perfumados, perfumes ou outros produtos odorantes;
- Não fumar nos 30 a 60 minutos anteriores à prova;
- Não consumir café ou outros produtos de aromas e sabores fortes, tais como pastilhas elásticas ou rebuçados;
- Para que não haja influência de outros provadores envolvidos na prova, estas devem realizar-se em cabines individuais evitando assim o contato visual entre os provadores.
-

Escala de avaliação

1 = Desgostei muitíssimo
2 = Desgostei muito
3 = Desgostei
4 = Não gostei nem desgostei
5 = Gostei
6 = Gostei muito
7 = Gostei muitíssimo

